



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Química

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Instituto de Investigación y Análisis Alimentario

Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de fármacos y sustancias de abuso en muestras acuosas

Fdo: Inés Racamonde Varela

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

SANTIAGO DE COMPOSTELA

Abril, 2015



D. José Benito Quintana Álvarez y Dña. María del Rosario Rodil Rodríguez, profesores del departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,

como directores de la Tesis Doctoral titulada «Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de fármacos y sustancias de abuso en muestras acuosas» presentada por Dña. Inés Racamonde Varela, alumna del Programa de Doctorado Ciencia y Tecnología Química,

AUTORIZAN la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado y que como directores de la misma no incurren en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Santiago de Compostela, a 9 de abril de 2015

Fdo: José Benito Quintana Álvarez

Fdo: María del Rosario Rodil Rodríguez



D. José Benito Quintana Álvarez y Dña. María del Rosario Rodil Rodríguez, como directores de la Tesis titulada «Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de fármacos y sustancias de abuso en muestras acuosas»,

por la presente DECLARAN:

Que la Tesis presentada por Dña. Inés Racamonde Varela es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el investigador en formación tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Que los artículos que forman parte del trabajo de esta Tesis han sido realizados durante la etapa de los estudios de doctorado y que han sido aceptados en revistas de reconocido impacto internacional con revisión anónima por pares de acuerdo con el artículo 41 del presente Reglamento.

Que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta Tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra Tesis Doctoral, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 9 de abril de 2015

Fdo: José Benito Quintana Álvarez

Fdo: María del Rosario Rodil Rodríguez



AGRADECEMENTOS

Ás veces resulta difícil poñer fin a unha etapa tan satisfactoria, na que fun tan feliz e que me fixo medrar e aprender tanto. Voltar a vista atrás e pensar nas persoas que me axudaron durante estes anos fai que a melancolía e un sorriso volten ó meu maxín. Agora novos retos están por chegar, e só agardo que estén tan cheos de ledicia e bos momentos coma os que pasei durante a etapa de Tese.

Por eso, nestas primeiras páxinas quero lembrarme de tódalas persoas e institucións que dunha forma ou doutra puxeron o seu gran de area para que eu chegase ata aquí e fose posible a presentación deste traballo.

En primeiro lugar, agradecer ó Ministerio de Ciencia e Innovación/de Economía e Competitividade (MICINN/MINECO) a financiación obtida a través dos proxectos CTQ2009-08377, CTQ2010-18927, CTQ2012-33080 e a concesión da beca FPI. Ó goberno da Xunta de Galicia a través do proxecto EM 2012/055 e das axudas para a “Consolidación e Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas” e fondos FEDER que permitiron financiar o desenvolvemento desta Tese.

Grazas ós profesores do departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela por ensinarme o bonito da Química Analítica e por facer que quixera seguir por este sendeiro.

Thank you to Dra. Sara Castiglioni and all your team (Dr. Ettore Zuccato, Dr. Renzo Bagnati and Dr. Ivan Senta) for your hospitality and your help during my research stay at Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (Milano).

Grazas o grupo de investigación GI-1626 (Cromatografía e Quimiometría) que tan cálidamente me acolleu e puxo a miña disposición tódolos medios que necesitei. Especial mención require o seu director Rafael Cela, grazas Rafael polo teu apoio, a túa comprensión e toda a axuda que me proporcionaches en todos e cada un dos momentos desta Tese. Podo decir sen ningunha dúbida que sen ti, este traballo non tería o mesmo fin.

Qué decir de Tito e Charo, os mellores directores de Tese que puiden ter, non existen palabras para agradecervos toda a formación que me destes e todo o cariño que recibín. Xuntos, formades un tándem imposible de superar! Durante estes anos compartimos moi bos momentos, tanto dentro coma fóra do labo e, aínda que pase o tempo, eu sempre gardarei un recordo moi especial de vólos dous.

Grazas ós rapaces do “insti”, por aguantar os meus momentos malos e darme ánimos para continuar. As risas que temos botado nos momentos do café ou da merenda facían que por un intre desconectase dos datos irreproducibles ou desa técnica maldita: Sara, Tamara, Eugenia, Jorge, Tania, Édgar, Inma, Beni... cada un de vós ten algo especial e se me poño a escribir anécdotas daríame para outra Tese (“marujas, que sodes todos uns marujas”). Convosco gardo momentos inesquecibles, (agardo que vós tamén os teñades connigo). Unha pena non estar ahí para vervos convertidos en doutores (Inma, ti non contas jeje). E na distancia, grazas Iria por “iniciarme no mundo das sustancias de abuso” e polo tráfico de artigos durante a etapa de escritura (tes acceso a este paper?).

Xanel, rapariga, aínda que por uns meses foses “rapaza do insti” as nosas vidas tomaron camiños un “pouco” diferentes. Pero ó fin conseguiche-las túas metas! No meu recordo quedan os bos momentos pasados contigo sempre tan optimista e cargada de enerxía, o teu apoio cando as cousas non saían e as túas “news, news, news”.

Grazas á miña xente de “fôra” coa que tantas veces puiden olvidarme da rutina da SPE, SPME e derivatizacións varias. Ahí estábades Ángeles, Noela, María, Sabela e Leticia para tomar un café no sitio de sempre. Cada unha de nós cunha vida diferente (incluso con un bebé de por medio ;-)) pero cando estamos xuntas doume conta que no esencial non cambiamos tanto.

Á miña familia, en especial ós meus papás que tantas cousas sacrificaron para que eu estivera hoxe escribindo esta Tese, aínda que ás veces non entendédeses as miñas preocupacións sempre estivestes para decirme que todo ía saír ben. Tantos momentos que me perdín por razóns diversas, agardo que poidan ser en parte compensados con estas verbas.

E por último grazas a ti Luis, que sempre estiveches ahí, apoiándome, axudándome, mostrándome outro punto de vista e o máis importante: sacándome un sorriso e facéndome sentir especial con cada un dos teus maravillosos detalles. Esta Tese foi unha constante á hora de programar viaxes e findes, por iso, considero que tamén é un pouco túa. Agora xa finalizada, agárdanos un camiño xuntos que estou desexando percorrer. Ó teu lado nada pode saír mal, xa o sabes.

Inés RV



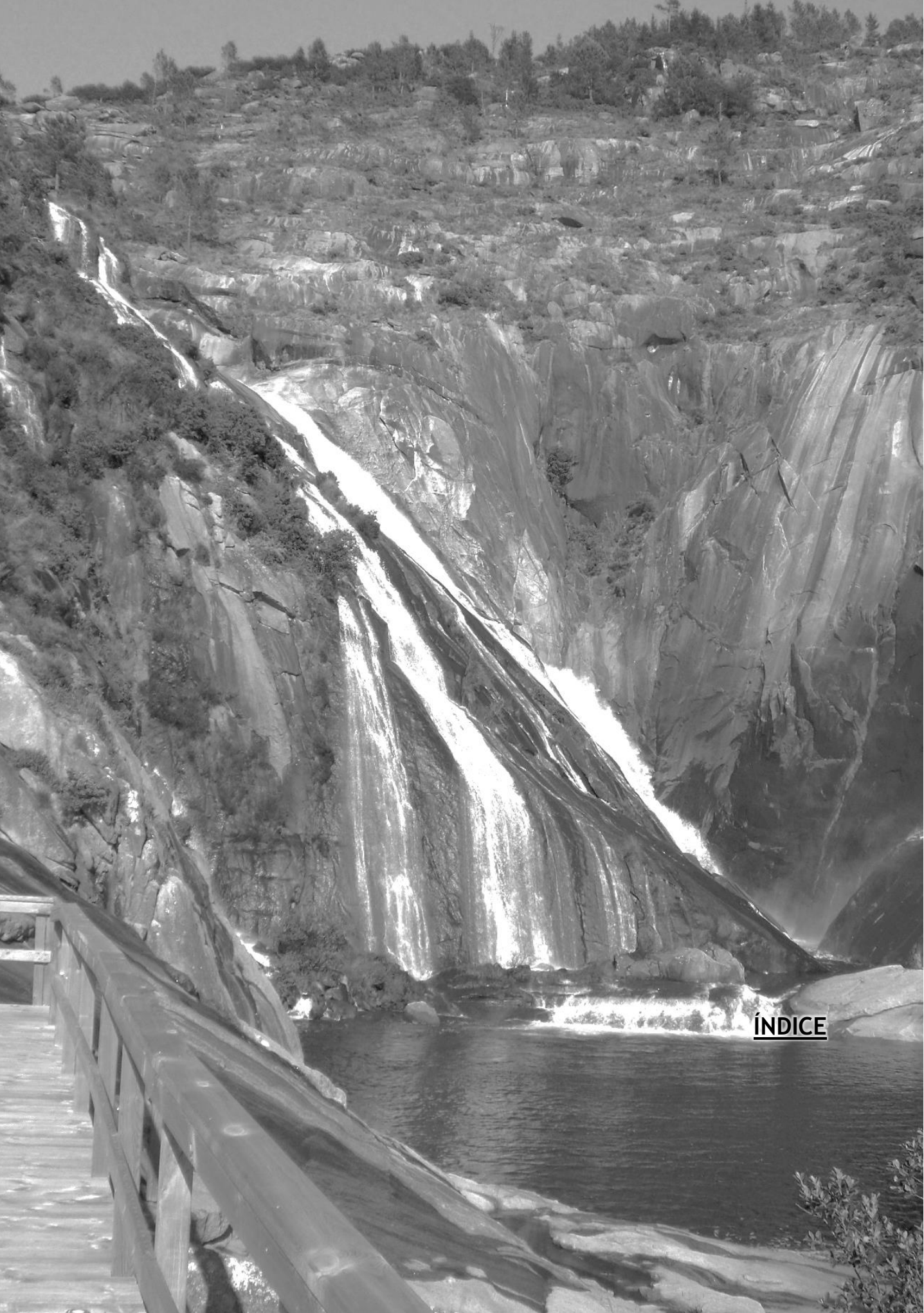
" Un día todo irá bien. he aquí nuestra esperanza.

Hoy todo va bien. he aquí nuestra ilusión. "

Voltaire







ÍNDICE



1.2.1.C	Metabolismo	48
1.2.1.D	Consumo	50
1.2.2	ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.....	52
1.2.2.A	Aspectos generales	52
1.2.2.B	Clasificación	53
1.2.2.C	Estructura y propiedades	54
1.2.2.D	Metabolismo	55
1.2.2.E	Consumo	57
2	INTERÉS MEDIOAMBIENTAL DE LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y FÁRMACOS.....	59
2.1	DROGAS DE ABUSO EN EL MEDIOAMBIENTE	59
2.2	BENZODIACEPINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN EL MEDIOAMBIENTE	62
2.3	ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN EL MEDIOAMBIENTE	66
2.4	ECOTOXICIDAD	68
2.4.1	CANNABINOIDES Y ESTIMULANTES DE TIPO ANFETAMÍNICO	68
2.4.2	BENZODIACEPINAS	70
2.4.3	ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	71
3	TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN	75
3.1	CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	75
3.1.1	DERIVATIZACIÓN	76
3.1.1.A	Derivatización mediante reactivos sililantes	77
3.1.1.B	Derivatización mediante reactivos acilantes	79
3.2	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	80

3.3 PRINCIPALES TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN PARA LOS	
COMPUESTOS ESTUDIADOS.....	81
3.3.1 CANNABINOIDES Y ESTIMULANTES DE TIPO ANFETAMÍNICO	81
3.3.2 BENZODIACEPINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS	87
3.3.3 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	89
4 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA LOS ANALITOS ESTUDIADOS.....	93
4.1 CONSIDERACIONES PREVIAS A LA EXTRACCIÓN DE LOS ANALITOS:	
ESTABILIDAD Y FILTRACIÓN	94
4.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	96
4.2.1 MODO DE TRABAJO.....	98
4.2.2 ADSORBENTES.....	99
4.2.3 DISPOSITIVOS COMERCIALES	104
4.2.4 VENTAJAS E INCONVENIENTES.....	105
4.2.5 APLICACIÓN DE LA SPE A LOS ANALITOS ESTUDIADOS	105
4.2.5.A Cannabinoides y estimulantes de tipo anfetamínico	106
4.2.5.B Benzodiazepinas, zolpidem y metilfenidato.....	110
4.2.5.C Antiinflamatorios no esteroideos.....	112
4.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN NO EXHAUSTIVAS EMPLEANDO	
AB/ADSORBENTES	114
4.3.1 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	116
4.3.1.A Dispositivo comercial y modo <i>in-tube</i>	116
4.3.1.B Modo de trabajo.....	117
4.3.1.C Derivatización	121
4.3.1.D Consideraciones teóricas.....	122
4.3.1.E Parámetros que afectan a la SPME.....	125
4.3.1.F Ventajas e inconvenientes de la SPME.....	129
4.3.1.G Aplicación de la SPME a los analitos estudiados	130
4.3.2 EXTRACCIÓN MEDIANTE ABSORCIÓN SOBRE BARRAS AGITADORAS.....	134
4.3.2.A Dispositivos comerciales.....	134

4.3.2.B	Modo de trabajo	135
4.3.2.C	Derivatización	135
4.3.2.D	Teoría	136
4.3.2.E	Ventajas e inconvenientes	136
4.3.2.F	Aplicación de la SBSE a los analitos estudiados	137
4.3.3	EXTRACCIÓN CON POLÍMEROS AB/ADSORBENTES DE BAJO COSTE	138
4.3.3.A	Dispositivos, modos de trabajo y consideraciones teóricas.....	139
4.3.3.B	Ventajas e inconvenientes	140
4.3.3.C	Aplicaciones	141
4.3.4	EXTRACCIÓN CON MATERIALES MODIFICADOS QUÍMICAMENTE.....	141
4.3.4.A	Síntesis y dispositivo	142
4.3.4.B	Modo de trabajo	143
4.3.4.C	Ventajas e inconvenientes	143
4.3.4.D	Aplicaciones	145
5	REFERENCIAS	147
	Índice de tablas contenidas en la introducción.....	169
	Índice de figuras contenidas en la introducción.....	171
III.	METODOLOGÍA DESARROLLADA	173
	INTRODUCCIÓN Y ESQUEMAS DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS.....	175
	PUBLICACIÓN III.1 <i>Determination of Δ^9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Δ^9-tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography–mass spectrometry</i>	185
	PUBLICACIÓN III.2 <i>In-sample derivatization-solid-phase microextraction of amphetamines and ecstasy related stimulants from water and urine</i>	193

PUBLICACIÓN III.3 <i>Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography-tandem mass spectrometry</i>	205
PUBLICACIÓN III.4 <i>Application of polypropylene tubes as single-use and low cost sorptive extraction materials for the determination of benzodiazepines and zolpidem in water samples</i>	221
PUBLICACIÓN III.5 <i>Fabric phase sorptive extraction: A new sorptive microextraction technique for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs from environmental water samples</i>	233
IV. CONCLUSIONES GENERALES	243
GENERAL CONCLUSIONS	249
V. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	253
ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	253
VI. ANEXOS.....	261
1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL CONTENIDO DE ESTA TESIS	263
<i>Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in Europe quantified by wastewater analysis</i>	
2. OTRAS PUBLICACIONES	279
3. ERRATUM	281





SUMMARY



This summary has been divided in three main parts: (1) aims where a general vision is presented, (2) a brief introduction of the techniques applied and the analytes considered and (3) the most relevant results and conclusions obtained from each published work. Further, general conclusions are given at the end of this dissertation, in Chapter IV.

1 AIMS

The PhD dissertation here presented is focused on the development of new methodologies for the determination of several analytes of special interest in water, namely drugs of abuse and pharmaceuticals. The main source of discharge of these analytes in environmental waters is through their incomplete metabolism and, again, incomplete removal in the wastewater treatment plants (WWTPs) [1]. Hence, their presence in several water compartments (treated and non-treated wastewater and surface water) was considered. The techniques here applied are based on the extraction using solid sorbents, as the well-established solid-phase extraction (SPE), and some modern non-exhaustive techniques (i.e, solid-phase microextraction (SPME), extraction with disposable polymers or with chemically modified fabrics). These non-exhaustive techniques are environmental friendly, with a minimum solvent consumption, and minimizing the global cost of the determination. Therefore, this Thesis has two main objectives:

1. To evaluate several extraction techniques for the determination of pharmaceuticals and drugs of abuse, including their main human metabolites.
2. To apply the proposed methods to several environmental water samples (wastewater and river water) in order to establish the concentration in the geographical area where this PhD was carried out, as a source of knowledge for future studies.

2 INTRODUCTION

2.1 Drugs of abuse

Consumption of illicit drugs is an issue of global concern that involves health, security and economy policies. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) estimates that cannabis is the first illicit drug by number of users (around 74 millions of Europeans had tested it in 2013) [2] and, in Spain, cannabis is the drug with the highest annual prevalence, only behind tobacco and alcohol [3]. On the other hand, amphetamines and their synthetic derivatives abuse trend was stabilized in the last years and their consumption is much lower than that of cannabis. Yet, it still stands in the second or third position in the list of illicit drugs consumption, depending on the country [2].

Drugs and their metabolites are excreted through urine and, to a minor extent, faeces, and thus, they occur in wastewater [4-6]. Then, if removal of these substances at WWTPs is not complete, they can reach rivers and lakes, which are potential sources for tap water production [7-10]. Most of the published methods for their determination are based on SPE, both with hydrophilic-lipophilic balance cartridges [5, 7, 11, 12] or using mixed-mode cation exchange [10, 13-15]. Although gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) is less complex and vulnerable to matrix effects than liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), determination of drugs of abuse has been carried out almost exclusively by LC or ultra(high)performance liquid chromatography (U(H)PLC) coupled to MS/MS [4-15] aiming to avoid a derivatization step. Nevertheless, ionization suppression leads to significant losses of sensitivity, especially for cannabinoids derivatives. For this reason, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its main human metabolite, 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), were not included in many earlier methods developed for drugs of abuse [16-18] or the limits of quantification (LOQs) reported in some others were so high that cannabinoids could not be detected in the analyzed samples [12, 13, 15].

The effect of illicit drugs over the aquatic organisms has not been studied in depth so far, but there are some evidences of possible harmful effects [19]. Besides, the presence of drugs of abuse in water can be used to estimate their consumption in a selected area. The group of Zuccato et al. [20] was the pioneer in this field. They used the concentration of the main metabolite of cocaine to estimate the consumption of this drug in Italy. Later, this methodology called “wastewater-based epidemiology”, was extended for further drugs, and now is being applied in several cities and considered as a complementary technique to the population surveys [21]. Thus, the development of new methods for the determination of illicit drugs in water is a topic of current interest.

2.2 Pharmaceuticals

Benzodiazepines (BZPs) are a broad family of pharmaceuticals prescribed as anxiolytics and hypnotic-sedatives, which share a benzene ring, a 1,4-diazepine and an aryl group in the C5 position. Zolpidem, not being a BZP itself, is included in the same therapeutic group because of its similar properties. Among the secondary effects of BZPs the dependence they can cause caused may lead to abuse and/or misuse [22]. In Spain, a constant increment of BZPs and related pharmaceuticals has been observed during the last ten years by the Ministry of Health, Social Services and Equal Rights [23]. On the other hand, some BZPs could be used for illicit purposes, such as robberies or sexual assaults [24]. Methylphenidate is another related pharmaceutical, prescribed for the treatment of attention disorders. It acts by controlling the neurotransmitters present in the extraneuronal space, being also prone to abuse/misuse. Among the undesirable effects of an abusive consumption, it can produce hallucinations, similarly to amphetamines. Moreover, ritalinic acid, its main metabolite, has been detected in concentrations up to $\mu\text{g L}^{-1}$ in a college campus in the United States, which particularly raised during the exams periods [25].

The presence of BZPs in the environment could be relevant, as in the case of the illicit drugs. Actually, many metabolites are still active and could thus affect the aquatic environment [26, 27]. However, the determination of BZPs in the environment, in contrast to biological samples, where they have been determined since many years [28], is a relatively recent topic. As a matter of fact, there was no specific methodology for the

measurement of a broad range of BZPs, related pharmaceuticals and their metabolites in water. Most times, a few BZPs are included in multi-residue methods targeted to different (illicit) drugs classes. As in the case of drugs of abuse, again SPE combined to LC-MS/MS have been the preferred techniques [4, 12, 29].

Although their presence in European wastewater and surface waters has been reported in a few studies, results are contradictory in some cases. For example, oxazepam and temazepam were detected at high concentrations (400-1000 ng L⁻¹) in the North and East of Europe [6, 12, 29], while in the South and West concentrations rounded 100 ng L⁻¹ [4, 30]. Conversely, chlordiazepoxide and bromazepam were found at higher concentrations in the South [4, 30] than in the North of Europe [16, 29, 31]. Indeed, the number of studies in this field is still very limited and much research should be done in order to obtain a realistic profile of the fate of these substances in the environment.

Finally, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), in particular arylpropionic and arylacetic derivatives (ibuprofen, ketoprofen, naproxen and diclofenac) are among the most studied pharmaceuticals in environmental waters in the last twenty years, due to their high consumption [32]. In contrast to the rest of compounds studied in this Thesis, their concentrations reached up to several µg L⁻¹ most of times and, although some of them are moderately removed at WWTPs, this is not enough for achieving undetectable effluent concentrations, being sometimes still at µg L⁻¹ levels. In particular, diclofenac has shown an extraordinary resistance to degradation and could become an ecotoxicological risk for aquatic organisms [27, 33]. For this reason, it has been included as a compound of special interest to be monitored in surface waters by the European Union in 2014 [34].

2.3 Extraction techniques

SPE is one of the most widely used techniques for the extraction of a wide variety of compounds from environmental samples. The high number of sorbents available (including the many new polymeric phases), its robustness and the low consumption of organic solvent in comparison with liquid-liquid extraction (LLE) have contributed to the quick development of SPE applications [35]. Actually, SPE is the preferred technique for

isolation and preconcentration of drugs of abuse, BZPs and NSAIDs [36]. On the other hand, the development of microextraction techniques has become increasingly relevant during last the decades, in part due to the low or null solvent consumption, which is sometimes expensive and produces wastes difficult to eliminate or harmful for the environment. Nowadays, these techniques, possessing a lower sorbent amount, represent a modern sample preparation alternative to SPE for the analysis of organic pollutants, due to their versatility and efficiency, while being environmentally friendly [35].

In 1989, SPME was the first microextraction technique proposed as an alternative to the classical ones, that was based on thermodynamic equilibrium [37]. Since that, its applications in the environmental and biological/clinical fields increased exponentially and, nowadays, SPME is an established methodology for sample preparation. Due to its versatility, SPME can be used for sampling of solid, liquid or gaseous samples, by direct immersion or head-space sampling, being a versatile and simple technique. Furthermore, there are some robotized systems that permit automated SPME extraction [37, 38]. Nevertheless, the low amount of extractant phase (typically 0.5 μL) is still an inconvenient for some analytes when high sensitivity is required. Thus, some years later, in 1999 Baltussen et al. [39] designed a new device with the aim of avoiding the main drawbacks of SPME, and, that technique was baptized as stir-bar sorptive extraction (SBSE). SBSE consists of a magnetic bar covered by a sorbent material (traditionally polydimethylsiloxane, PDMS) for the enrichment of the analytes. With this new configuration, the sorbent phase was increased from 10 to 150 times. This improved LODs for hydrophobic chemicals but also produced an increase of equilibrium time, because of the larger coatings thickness [39]. Also, SBSE (with PDMS) produces poor results for polar compounds, which together with the need for reutilization of SBSE devices and the lack of automation are its main disadvantages [40].

In 2004, Montero et al. [41] proposed the use of bulk commercial polymers as extractant materials, as an alternative to SBSE, but in this case, the magnetic bar was not integrated into the device. So, the problems related with the stripping or partial loss of the extractant phase were avoided. Moreover, the devices were much cheaper than the SBSE or SPME ones and, although they could be reused, it permitted a disposable use,

avoiding the risk of cross-contamination or carryover effect. Bulk polymers are available in several thickness, shapes, dimensions and chemical composition which can be chosen for each specific requirement. Several research works have demonstrated their simplicity as an alternative to other sorptive extraction techniques [40, 42].

Many research groups have developed their own sorbent materials in order to coat magnetic bars [35, 43] or, more recently, to cover organic supports in order to obtain a very flexible substract of high stability and capacity. In this sense, Kabir and Furton developed in 2014 a technique that they named fabric phase sorptive extraction (FPSE) [44], where the surface of an organic support, such as a fabric of cellulose or nylon was polymerized with an extractant material using the “sol-gel” technology. This permits obtaining a highly cross-linked porous material, with exceptional chemical and thermal stability and highly effective in the extraction of a large variety of compounds from many matrices. This innovative technique circumvented the problems of low sample capacity because the sol-gel technology yields a thin-film of extractant, which also favors kinetics, comparised with other microextraction techniques. Also, many different sorbents could be polymerized over the substrate, expanding its polarity range [45, 46].

3 ANALYTICAL METHODOLOGIES DEVELOPED

DETERMINATION OF Δ^9 -TETRAHYDROCANNABINOL AND 11-NOR-9-CARBOXY- Δ^9 -TETRAHYDROCANNABINOL IN WATER SAMPLES BY SOLID-PHASE MICROEXTRACTION WITH ON-FIBER DERIVATIZATION AND GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

As mentioned, the detectability of cannabinoids could be problematic when their determination is carried out by LC-MS/MS, so in this work an alternative, GC-MS, is presented. Moreover, SPME is presented as alternative to published SPE methods. Hence, the developed method consisted of the SPME using divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) as coating. SPME allows to reducing the amount of sample down to 10 mL with a null consumption of organic solvents. Two silylating reagents were tested: N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and N-Methyl-N-*tert*-(butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA), providing the first one the best results when the fiber was

exposed to its vapors. The sample pH and the ionic strength were evaluated together through a Doehlert design, permitting the study of these two factors at several levels with a small number of experiments. The optimal conditions were pH = 2 without salt addition. The effect of the temperature over the kinetics was also tested and lower equilibrium times were obtained at the highest temperatures at the expense of lower extraction efficiencies. Therefore, a compromise situation of 60 min at 60 °C was selected as to match with the chromatographic run time. Under the optimized conditions, LOQs of 3 and 8 ng L⁻¹ for THC and THCCOOH respectively were achieved. The trueness, using surrogated internal standards, was satisfactory (92-112 %) in the three matrices tested (raw and treated wastewater and surface water) and the precision (expressed as % RSD) was lower than 15 % in the dirtiest water and lower than 3 % in the cleanest.

Finally the method was applied to four raw and treated wastewater samples, where the presence of THCCOOH was around 50-150 ng L⁻¹ in the raw wastewater samples while THC was at the 20 ng L⁻¹ level. Both analytes were also detected in treated wastewater and river that receives the WWTPs discharges at very low concentrations.

IN-SAMPLE DERIVATIZATION-SOLID-PHASE MICROEXTRACTION OF AMPHETAMINES AND ECSTASY RELATED STIMULANTS FROM WATER AND URINE

Following the same approach as in the previous work, SPME followed by GC-MS was evaluated as a robust, simple and easy to perform technique for the determination of five analytes of the family of amphetamines and ecstasy compounds at trace levels in environmental waters. In this case, an in-sample derivatization using a chloroformate water-stable derivative (isobutylchloroformate, iBCF) was used, reducing the time consumption, sample handling and improving the extractability of the analytes. The ionic strength, the amount of basic catalyzer and the percentage of derivatizing reagent were optimized using a Box-Behnken design. Optimal conditions consist on: no salt added to the sample, the basic catalyzer (dipotassium hydrogen phosphate) fixed at 100 mM, and iBCF at 0.05 %. Extraction kinetics were again studied and derivatization/extraction time was fixed on 40 min at 60 °C. The method showed an excellent figures of merit with LOQs between 1.4-6.8 ng L⁻¹ and relative recoveries using internal standard deuterated compounds near 100 %.

Moreover, the method was downscaled and validated with urine samples, since these analytes are also of interest in toxicological analysis. In this case, only 1 mL of urine (diluted to 10 mL with ultrapure water) was enough to reach LOQs in the range of 0.06 to 0.3 ng mL⁻¹. The calibration curve was linear until 500 ng mL⁻¹ and the relative recoveries at two levels of concentration (5 and 50 ng mL⁻¹) ranged from 99 to 111 % with precision in terms of RSD lower than 11%.

Finally the method was applied to water samples, where methamphetamine and 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA or ecstasy) were the most frequently detected substances, whereas 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) was the least frequent one. Analytes were also detected in surface waters below LOQs, except in one of the samples, where MDA and MDMA reached concentrations of 39 ng L⁻¹ and 12 ng L⁻¹, respectively.

DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES, RELATED PHARMACEUTICALS AND METABOLITES IN WATER BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND LIQUID-CHROMATOGRAPHY–TANDEM MASS SPECTROMETRY

In this work, SPE was applied to the extraction of a 23 pharmaceuticals, including BZPs and their main metabolites, zolpidem, methylphenidate and ritalinic acid in wastewater and surface water. Oasis MCX cartridges (60 mg) were selected to extract 100 or 200 mL of water (influent, effluent or river water) without pH adjustments, because they provided better recoveries than Oasis HLB or Oasis MAX. Analytes were eluted using 5 mL of MeOH/NH₃ (1.25 %) which was further evaporated to dryness. The final reconstitution volume was selected bearing in mind matrix effects, as a lower volume is not necessarily translated in lower LOQs since matrix constituents are concentrated too. Under optimal conditions a final volume of 100 µL was selected. Determination was done by LC-MS/MS by using acetic acid (0.1 %) as eluent buffer modifier. The stability of the compounds in wastewater was evaluated under different conditions of storage. An adjustment to acidic conditions (pH 2) and refrigeration (4 °C) seems to be the best conditions to maintain their concentration unchanged, except for the 7-amino metabolites of clonazepam and flunitrazepam that could not be detected when the sample was acidified. Thus, samples should not be acidified if such analytes are to be measured and samples should be analyzed as soon as possible.

The method showed excellent figures of merit (LOQs between 0.1 and 18 ng L⁻¹, relative recoveries using deuterated internal standard in the 84-122% range and % RSD from 3 to 21 %). The application of the method to real samples showed the presence of ritalinic acid for the first time in Spain at concentrations up to 100 ng L⁻¹, being even detected in surface water. Also the presence of diazepam and their main metabolites (oxazepam, temazepam and nordiazepam) and zolpidem was also noticeable.

ASSESSMENT OF POLYPROPYLENE TUBES AS SINGLE-USE AND LOW-COST SORPTIVE EXTRACTION MATERIALS FOR THE DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES AND ZOLPIDEM IN WATER SAMPLES

In this work, three polymers of different polarities, namely polypropylene (PP), PDMS and polyethersulphone (PES), were tested in order to achieve the extraction BZPs and zolpidem from water samples as a cheaper and easier handling alternative to SPE. The determination was carried out using a LC-MS/MS system again. The PP polymer provided the best recoveries for all the analytes except for those with nitro moieties (clonazepam and flunitrazepam), where PES was equally valid. The sample pH, the ionic strength and their interactions were studied using a central composite design. The results of this experiments showed a positive effect in the response when salt was added to the sample while the best pH was 9. No second order interactions between two factors were observed. Extraction kinetics, the amount of extractant and sample volume were evaluated independently. The selected conditions were a volume of 70 mL stirred during 14 h with 4 PP fibers (ca. 4 mg of sorbent). These fibers were then desorbed during 5 minutes with 1 mL of acetone. Finally the extract was further evaporated to dryness, reconstituted in 50 µL of MeOH and 10 µL were injected into the LC-MS/MS.

The LOQs achieved with this new method were in the same order as the previously method (based on SPE) except for the 7-amino metabolites, where the values were one order of magnitude higher. Also, trueness and repeatability were in the same order of magnitude than SPE, proving that low cost polymers may serve as an alternative, but with an important decrease in the use of organic solvents and the overall cost of the extraction process at the expenses of a long, but simple and unattended, extraction time.

Samples of wastewater (raw and treated water) and river water samples were analyzed. The BZPs detected were in the same concentration than the provided by the SPE method.

FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION: A NEW MICROEXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES.

In this work, a new microextraction technique, FPSE, where the solid sorbent synthesized through the “sol-gel” technology was coated over a thin fabric, was tested. For this purpose the selected analytes were four NSAIDs, because of their interest and background in terms of already developed sorptive microextractions in the literature, which could be used as a benchmark. The FPSE devices were synthesized by the Florida International University, while analytical experiments were performed at the University of Santiago de Compostela. Due to the easy and opened geometry, FPSE equilibrium times were relatively short, from 45 to 200 minutes, with 30 mL samples. The effect of sample pH, ionic strength and coating were evaluated through a mixed-level factorial design. Under optimal conditions 30 mL of filtered water sample with the pH adjusted to 2 was exposed to a polyethylene glycol fabric phase during 120 minutes under stirring. After that, the media was removed, dried and desorbed in 1 mL of ethyl acetate for 15 min. The extract was concentrated to dryness and reconstituted in 40 μ L of solvent. Derivatization of the analytes was carried out by addition of 10 μ L of MTBSTFA and heating the mixture in an oven at 60 $^{\circ}$ C during 60 min.

The determination provided very low LOQs (3-15 ng L^{-1}) similar to or better than those obtained by other non-exhaustive extractive techniques. Also, negligible matrix effects were found, even when complex samples were analyzed (raw and treated wastewater) and so, quantification can be performed without surrogated isotopically labelled standards or standard addition protocols. Trueness and precision were evaluated in the three matrices studied with recoveries between 82 and 116 % and precision (as % RSD) between 4 and 18 %.

The application to real samples showed an increase in the concentration of ibuprofen respect to studies performed in the same area some years ago, while the presence of the other NSAIDs remain in the same levels.

4 REFERENCES

- [1] E.N. Evgenidou, I.K. Konstantinou, D.A. Lambropoulou, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 905-926.
- [2] European Drug Report. Trends and developments 2014. Luxembourg (2014). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Available at: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_228272_DE_TDAT14001DEN.pdf
- [3] National Report 2012 (data of 2011) of the OEDT by the National Focal Point REITOX. Evolution, trends and particular questions (in Spanish). Ministry of Health, Social Services and Equal Rights (2012).
- [4] V. Borova, N. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos, N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1-13.
- [5] T. Nefau, S. Karolak, L. Castillo, V. Boireau, Y. Levi, J. *Total Environ.* 461-462 (2013) 712-722.
- [6] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, *Chemosphere* 89 (2012) 1399-1406.
- [7] P. Vázquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2851-2864.
- [8] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Environ. Int.* 36 (2010) 75-84.
- [9] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6809-6816.
- [10] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, C. Chiabrando, P. Grassi, R. Fanelli, *Water Res.* 42 (2008) 961-968.
- [11] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3821-3829.
- [12] M. Östman, J. Fick, E. Näsström, R.H. Lindberg, *Sci.Total Environ.* 472 (2014) 862-871.
- [13] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, M. González-Díez, R. Cela, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1708-1717.
- [14] C. Metcalfe, K. Tindale, H. Li, A. Rodayan, V. Yargeau, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3179-3185.
- [15] L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibáñez, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3078-3089.

- [16] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1620-1631.
- [17] K.J. Bisceglia, A.L. Roberts, M.M. Schantz, K.A. Lippa, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 2701-2712.
- [18] A.C. Chiaia, C. Banta-Green, J. Field, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 8841-8848.
- [19] E.J. Rosi-Marshall, D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, A. Paspalof, J.L. Tank, J. Hazard. Mater. 282 (2015) 18-25.
- [20] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, D. Calamari, R. Bagnati, S. Schiarea, R. Fanelli, Environ. Health 4 (2005) 1-14.
- [21] S. Castiglioni, K.V. Thomas, B. Kasprzyk-Hordern, L. Vandam, P. Griffiths, Sci. Total Environ. 487 (2014) 613-620.
- [22] R.C.O. Voshaar, J.E. Couvée, A.J.L.M. van Balkom, P.G.H. Mulder, F.G. Zitman, Brit. J. Psychiat. 189 (2006) 213-220.
- [23] General survey over alcohol and drugs in the general population of Spain (EDADES) 2011-2012 (in Spanish). Ministry of Health, Social Services and Equal Rights. Available at: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>.
- [24] Sexual assaults facilitated by drugs or alcohol. Lisbon (2008). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Available at: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_50544_EN_TDS_sexual_assault.pdf
- [25] D.A. Burgard, R. Fuller, B. Becker, R. Ferrell, M.J. Dinglasan-Panlilio, Sci. Total Environ. 450-451 (2013) 242-249.
- [26] T. Brodin, J. Fick, M. Jonsson, J. Klaminder, Science 339 (2013) 814-815.
- [27] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, Aquat. Toxicol. 76 (2006) 122-159.
- [28] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, J. Chromatogr. Sci. 51 (2013) 587-598.
- [29] D. Hummel, D. Loeffler, G. Fink, T.A. Ternes, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 7321-7328.
- [30] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, Water Res. 45 (2011) 1432-1442.
- [31] S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4989-5000.
- [32] J. Simó Miñana, Aten. Primaria 44 (2012) 335-347.
- [33] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello, Sci. Total Environ. 429 (2012) 123-155.

- [34] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off. J. Eur. Lex L226, 24/08/2013.
- [35] J. B. Quintana, M. Ramil, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela; New sample preparation strategies for analytical determinations. in: R. A. Meyers (ed). Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, New York (2014).
- [36] P. Vázquez-Roig, C. Blasco, Y. Picó, Trends Anal. Chem. 50 (2013) 65-77.
- [37] J. Pawliszyn. Solid Phase Microextraction, theory and practice. Wiley-VCH, New York (1997).
- [38] J. Pawliszyn, Applications of Solid Phase Microextraction, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999)
- [39] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 737-747.
- [40] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2642-2666.
- [41] L. Montero, P. Popp, A. Paschke, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 1025 (2004) 17-26.
- [42] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, M. Möder, Anal. Chim. Acta 716 (2012) 119-127.
- [43] M. He, B. Chen, B. Hu, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 2001-2026.
- [44] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (FPSE), US Patent Application US14/216,121, March 17, 2014.
- [45] A. Kumar, Gaurav, A.K. Malik, D.K. Tewary, B. Singh, Anal. Chim. Acta 610 (2008) 1-14.
- [46] A. Kabir, K.G. Furton, A. Malik, Trends Anal. Chem. 45 (2013) 197-218.





I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



El consumo de drogas de abuso es un problema social reconocido a nivel mundial. La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (*United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC*) [1] estimó que en 2012 alrededor de 247 millones de personas habrían consumido alguna droga ilícita y la tendencia muestra un constante incremento hacia el consumo de éxtasis y cannabis. De hecho, el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA*) posiciona ésta última como la droga de mayor consumo en Europa y España [2]. Por otra parte el consumo de fármacos, entre ellos los pertenecientes al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (*non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs*) y los ansiolíticos e hipnótico-sedantes, no ha dejado de crecer en nuestro país mostrando un incremento sustancial en los últimos años, en especial para esta última familia [3-5].

Se sabe que todas estas sustancias no son metabolizadas completamente por el organismo [6] y que tanto las drogas como los fármacos pueden ser desechados directamente a través de los sanitarios. Por lo que en última instancia terminarán en las plantas de tratamiento de agua residual (*wastewater treatment plants, WWTPs*) pudiendo alcanzar las aguas superficiales si su eliminación no es completa [7, 8]. La concentración de estos compuestos en el medio natural puede alcanzar niveles elevados y sus efectos sobre los organismos podrían ser preocupantes [9, 10]. Por ello, la Unión Europea ha decidido incluir por primera vez un NSAID (el diclofenaco) en la primera "Watch List" de compuestos a monitorizar en el medio acuático [11].

Por estas razones es necesario disponer de la metodología analítica que permita la determinación de estas sustancias de forma exacta y precisa. El empleo de técnicas de extracción que se centren en minimizar el tiempo, coste y esfuerzo parecen ser las más adecuadas y es en su desarrollo aplicado a los compuestos anteriormente mencionados en el que se va a centrar el trabajo de esta Tesis.

Por ello, como **objetivos generales** se plantearon:

- El desarrollo de metodologías respetuosas con el medio ambiente, que limiten el consumo de muestra y disolventes, minimicen los riesgos de exposición y los costes generados de su aplicación, y que permitan su automatización en la medida de lo posible.

- La aplicación de los métodos propuestos a diferentes matrices acuosas con el fin de determinar la concentración de los analitos en la zona de estudio y poder realizar una comparativa con los resultados proporcionados por otros autores para esta y otras zonas.

Los **objetivos específicos** para cada familia de analitos se pueden resumir a continuación:

A. Drogas de abuso

Dentro de esta familia se estudiarán los derivados del cannabis, las anfetaminas y sus derivados sintéticos por ser unas de las drogas ilícitas más consumidas en España y en el mundo. El análisis de biomarcadores específicos para estas drogas (11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol, anfetamina, metanfetamina y metilendioximetanfetamina) en agua residual, es empleado en los estudios epidemiológicos a través del agua residual (*wastewater-based epidemiology*) para determinar el consumo de las mismas en una determinada región de una forma rápida y objetiva [12]. Por esta razón, en las metodologías desarrolladas en esta Tesis se prestará especial atención a la determinación fiable y precisa de estos analitos en aguas residuales.

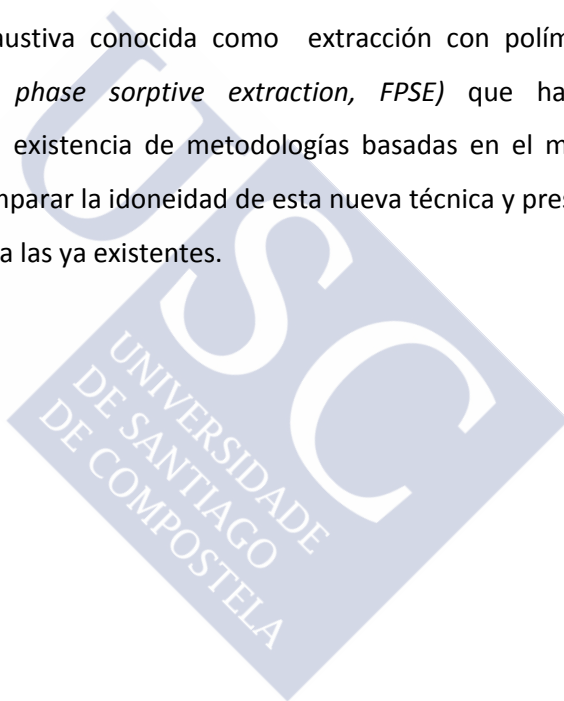
Se buscarán alternativas a la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction, SPE*) y la determinación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*). Para ello se propondrán técnicas de microextracción que minimicen el consumo de muestra y permitan su determinación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*gas chromatography coupled to mass spectrometry, GC-MS*) con el fin de obtener metodologías simples, robustas, automatizables y menos costosas que puedan ser implantadas en laboratorios de rutina.

B. Fármacos

En primer lugar, se considerarán un total de 23 analitos que incluyen benzodiazepinas y otros fármacos relacionados con ellas, así como algunos de sus principales metabolitos. Debido a la escasa o nula metodología disponible para algunos de estos compuestos en muestras medioambientales, en primer lugar se planteará la SPE y la determinación mediante LC-MS/MS como técnica de referencia que se validará de acuerdo a los estándares de calidad de las metodologías analíticas. Por otra parte, se

propondrá un abordaje desde el punto de vista de las técnicas de extracción no exhaustivas (extracción con polímeros de bajo coste). Además, los resultados obtenidos podrán ser comparados con los obtenidos a través de una metodología de extracción exhaustiva como es la SPE, previamente desarrollada.

Debido al elevado consumo de NSAIDs, su determinación en matrices acuosas ha sido estudiada en profundidad durante las últimas décadas, por lo que existen numerosas metodologías basadas tanto en técnicas de microextracción como en SPE. Sin embargo, su determinación sigue siendo un asunto relevante [13-15]. Por ello, se ha decidido seleccionar la familia de los NSAIDs para llevar a cabo la validación de una nueva técnica de extracción no exhaustiva conocida como extracción con polímeros modificados químicamente (*fabric phase sorptive extraction, FPSE*) que ha sido patentada recientemente [16]. La existencia de metodologías basadas en el mismo principio de equilibrio permitirá comparar la idoneidad de esta nueva técnica y presentarla como una posible alternativa a las ya existentes.



REFERENCIAS

- [1] World Drug Report 2014. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), New York (2014). Disponible en:
www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf
- [2] European Drug Report. Trends and developments 2014. Luxembourg (2014). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Available at:
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_228272_DE_TDAT14001DEN.pdf
- [3] Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en España durante el período 2000-2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2013). Disponible en:
<http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/AINE.pdf>
- [4] Uso de benzodiazepinas en España 1992-2006. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Disponible en:
http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/ansioliticos_hipnoticos.pdf
- [5] Encuesta sobre alcohol y drogas en la población general en España (EDADES) 2011-2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Disponible en:
<http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>
- [6] R.C. Baselt, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, (7th ed.), Biomedical Publications, Foster City (2004).
- [7] Pharmaceuticals in drinking-water. World Health Organization (WHO). Switzerland (2012). Disponible en:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241502085_eng.pdf
- [8] M. Petrović, D. Barceló (eds), Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle, Elsevier, Amsterdam (2007).
- [9] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122-159.
- [10] E.J. Rosi-Marshall, D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, A. Paspalof, J.L. Tank, J. Hazard. Mater. 282 (2015) 18-25.
- [11] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Lex* L226, 24/08/2013.
- [12] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 1027-1032.

- [13] O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J. N. Lester, Ecotoxicity of pharmaceuticals. en: M. Petrović, D. Barceló, (eds). Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. Elsevier, Amsterdam (2007), pp. 387- 2 .
- [14] H. Sanderson, D.J. Johnson, C.J. Wilson, R.A. Brain, K.R. Solomon, Toxicol. Lett. 144 (2003) 383-395.
- [15] M. Cleuvers, Ecotox. Environ. Safe. 59 (2004) 309-315.
- [16] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (FPSE), US Patent Application US14/216,121, March 17, 2014.







II. INTRODUCCIÓN



1 COMPUESTOS ESTUDIADOS

1.1 DROGAS DE ABUSO

El término “droga” ha sido aplicado por la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*) para definir a “todas aquellas sustancias naturales o sintéticas que, al ser introducidas en el organismo son capaces de modificar alguna de sus funciones”. Esta terminología es bastante amplia y engloba a un gran número de moléculas. De forma más concreta, la WHO emplea los términos “psicoactivo” y “psicotrópico” para referirse a “todas aquellas sustancias naturales o sintéticas que actúan específicamente sobre el sistema nervioso central alterando la conciencia y la conducta de las personas que las están consumiendo”. Ambas nomenclaturas son equivalentes aunque, de forma más restrictiva, las sustancias psicotrópicas son aquellas que están controladas por la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (*International Narcotics Control Board, INCB*) y que están recogidas en el Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas acordado en Viena en 1971 y ampliado en sucesivas ocasiones. En esta lista se incluyen anfetaminas, cannabinoides, benzodiacepinas, barbitúricos y somníferos entre otros [1].

Actualmente uno de los mayores problemas a nivel médico, social y político se encuentra en el consumo de drogas y en particular en el policonsumo donde se entremezclan sustancias legales (alcohol, tabaco, fármacos...) con otras sustancias no permitidas según la legislación vigente española (cannabis, heroína, cocaína...). Por otra parte, se debería diferenciar entre los usos lícitos e ilícitos que se le pueden dar a una determinada sustancia. De esta diferenciación se deduce que muchas sustancias legales pueden derivar en un uso ilícito como puede ocurrir en el caso de algunos medicamentos como las benzodiacepinas y compuestos relacionados si son administradas con otros fines en lugar de los puramente médicos [2].

La presencia de drogas en el organismo se manifiesta con cuadros de estimulación y/o depresión pudiendo causar cambios bruscos en la percepción del medio. Son aquellas sustancias que producen efectos de relajación, euforia y desinhibición las que tienden a consumirse en exceso, provocando una mayor dependencia en el individuo. A lo largo de

los años, diferentes organismos encargados de monitorizar el consumo de estas sustancias han observado un incremento o una leve estabilización en la prevalencia de las mismas, pero nunca una disminución apreciable, a pesar de las políticas de prevención y desintoxicación que se han llevado a cabo en los diferentes países.

El término “de abuso” ha sido empleado por la WHO para englobar a todas aquellas sustancias que “generen un modelo de uso caracterizado por un consumo continuado, a pesar de que el sujeto sabe que tiene un problema social, laboral, psicológico o físico que es persistente o recurrente y que está provocado o estimulado por el consumo periódico de esas sustancias” [3]. Por lo tanto a lo largo de esta Tesis se van a agrupar bajo el término “drogas de abuso” aquellas sustancias prohibidas por la legislación española que se consumen con el fin de alterar la conciencia y en particular este trabajo se centra en los cannabinoides y los estimulantes de tipo anfetamínico. Si bien otras sustancias estudiadas en esta Tesis (benzodiacepinas, zolpidem y metilfenidato) también pueden derivar en un consumo ilícito y/o abusivo se ha decidido incluirlos dentro de la sección “1.2 Fármacos” por tratarse de sustancias legales en las que su consumo está recomendado y controlado por un médico.

1.1.1 DERIVADOS DEL CANNABIS

1.1.1.A Aspectos generales

“Cannabis” es el término general que se usa para nombrar a los diferentes preparados psicoactivos de la planta de marihuana o cáñamo (*Cannabis sativa*) y que incluye las hojas, la resina derivada de los ápices florales de la planta (hachís) y el aceite de hachís que se obtiene a partir de una extracción con aceite vegetal. El cannabis contiene al menos 60 compuestos con una estructura similar de 21 carbonos que se unen formando un ciclohexeno, un benceno, un tetrahidropirano y diferentes sustituyentes hidrocarbonados que reciben el nombre de cannabinoides. El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), es uno de los compuestos más importantes de esta familia ya que es el que se encuentra en mayor proporción en la planta de marihuana (pudiendo llegar a alcanzar, en el caso del aceite de hachís, un 30 % del total de cannabinoides presentes en él) y además es el que le confiere el poder psicoactivo. El THC es muy soluble en lípidos lo que hace que

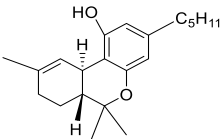
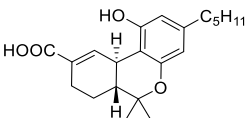
su liberación sea lenta y su efecto se prolongue durante varios días. Otros compuestos como el Δ^8 -tetrahidrocannabinol, el cannabinol o el cannabidiol tienen una presencia en la planta casi residual en comparación con el THC y un poder adictivo mucho más bajo o casi nulo [2, 4-6].

El consumo no controlado de cannabis produce una sensación de euforia, altera las habilidades motoras, modifica las percepciones sensoriales, pudiendo manifestarse situaciones de ansiedad, paranoia y, a menudo, retraimiento social. Además, sus efectos aumentan si se combina con alcohol u otras drogas. Por otra parte, existen diferentes preparados farmacéuticos a base de cannabinoides que han demostrado su efectividad para minimizar los dolores crónicos y espasmos, contrarrestar las náuseas en la quimioterapia oncológica y en tratamientos de VIH [2].

1.1.1.B Estructura y propiedades

A continuación, se recogen en la tabla II.1 las principales propiedades fisicoquímicas de los derivados del cannabis estudiados en esta Tesis: el THC, por ser el compuesto de mayor abundancia en el cannabis y su principal metabolito humano, el 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THCCOOH). Como se puede observar, tanto el THC como el THCCOOH poseen dos centros quirales en su estructura por lo tanto existen cuatro diastereoisómeros posibles, sin embargo sólo los isómeros trans se encuentran en la naturaleza y son los que se recogen en la tabla II.1. En el medio acuático el THC se encuentra en forma neutra mientras que el THCCOOH está en su forma desprotonada debido a su carácter ácido y así lo demuestran sus valores de pK_a (9.8 frente a 4.6, respectivamente). En cuanto a su tendencia a ser adsorbidos por la materia orgánica, el THC presenta un valor de log D al pH de las aguas naturales más alto que el de THCCOOH por lo que su carácter lipofílico es mayor y podría adsorberse en la materia orgánica de forma más relevante. Por otra parte, ambos compuestos presentan una presión de vapor muy baja.

Tabla II.1. Estructura y principales propiedades fisicoquímicas de los cannabinoides a estudiar. Valores estimados de pK_a , $\log D$, $\log K_{ow}$ y P_{vapor} recogidos en la base de datos Scifinder [7]. MW: peso molecular, P_{vapor} : presión de vapor.

Compuesto	Estructura	Fórmula	MW	CAS	pK_a	$\log D$ ($pH=7$, $25\text{ }^{\circ}C$)	$\log K_{ow}$	$P_{vapor}/$ torr
THC		$C_{21}H_{30}O_2$	314.2	1972-08-3	9.8	6.8	6.8	1.2×10^{-6}
THCCOOH		$C_{21}H_{28}O_4$	344.4	56354-06-4	4.6	2.9	5.2	1.6×10^{-9}

1.1.1.C Metabolismo

El THC entra en el organismo fundamentalmente a través de la inhalación de pipas de agua o cigarrillos, se absorbe en los pulmones y es distribuido por todo el organismo. Una vez que ha entrado en el torrente sanguíneo se une mayoritariamente a las lipoproteínas debido a su carácter lipofílico. Esto hace que tarde en ser eliminado del organismo completamente con lo que su presencia en el cuerpo humano puede durar varios días, siendo el hígado, riñón, bazo y otros tejidos adiposos en los que se presenta una mayor acumulación [6].

El THC puede ser detectado en plasma a los pocos segundos de ser inhalado mostrando una vida media en el organismo entre 20 horas y 13 días dependiendo de la frecuencia de consumo. Inicialmente en su ruta de metabolización intervienen enzimas hepáticas que lo oxidan a derivados hidroxilados. La hidroxilación en la posición 11 es la más importante dando lugar a 11-hidroxi- Δ^9 -THC, un derivado que puede oxidarse nuevamente y convertirse en THCCOOH. Aproximadamente un 70 % de la dosis de THC se excreta a través de las heces (40 %) y la orina (30 %) en 72 horas en forma de diversos metabolitos [6, 8] dónde el THCCOOH representa aproximadamente un 0.6 % respecto a la dosis de THC consumida [9]. Sin embargo, a pesar de su bajo porcentaje de excreción, el THCCOOH se emplea como indicador de consumo de THC cuando se analizan aguas residuales ya que se trata de uno de los metabolitos más estables en el medio acuoso [10,

11]. Otros compuestos derivados del metabolismo del THC son el 8α -hidroxi- Δ^9 -THC, el 8β -hidroxi- Δ^9 -THC y el 8α -11-dihidroxi- Δ^9 -THC excretados en forma de glucorónidos conjugados, pero su presencia es aún más minoritaria que la de THCCOOH [5, 8].

1.1.1.D Consumo

El cannabis es una de las drogas más consumidas tras el tabaco, el alcohol y la cafeína. Datos proporcionados por el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) basados en encuestas poblacionales y publicados en 2014 reflejan que casi 74 millones de europeos han consumido cannabis al menos una vez en la vida, lo que equivaldría aproximadamente a 1 de cada 5 personas entre 15 y 64 años [12]. Estos datos posicionan al cannabis como la primera droga ilegal en cuanto al número de personas que lo han probado alguna vez situándose muy lejos de la cocaína, las anfetaminas o el éxtasis (14.1, 11.4 y 10.6 millones de europeos, respectivamente). En la última encuesta publicada, el EMCDDA observó una ligera tendencia a la estabilización en el consumo de cannabis en los últimos cinco años (a pesar de que su consumo sigue siendo muy elevado), con alguna excepción como los países nórdicos o Bulgaria en los que se apreció un ligero aumento respecto a años anteriores. En cuanto al consumo por países, España posee una de las mayores prevalencias de consumo alguna vez en la vida con un 27.4 % (datos correspondientes a 2011) solamente superada por Francia (32.1 %), Dinamarca (35.6 %) y Reino Unido (30.0 %) y al mismo nivel que los Países Bajos (25.7 %), República Checa (27.9 %) e Irlanda (25.3 %) [12]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los datos con los que se elaboran estos informes proceden de los distintos organismos nacionales que se encargan de realizar las encuestas. Los últimos datos publicados para la mayoría de los países europeos pertenecen a los años 2010-2012, aunque pueden oscilar desde 2007 para Italia hasta 2013 para Dinamarca observándose un cierto retraso respecto al momento actual [12].

El Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad también publica regularmente la encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en la población general en España (EDADES) en la que se recogen datos sobre el consumo de sustancias de abuso y tendencias a nivel nacional [13]. El último informe publicado ha sido el correspondiente

al año 2011 y estos datos se encuentran recogidos detalladamente en el informe anual de la Red Europea de Información sobre Drogas y Adicciones (*European Information Network on Drugs and Drug Addiction, REITOX*) del año 2012 [14]. A la vista de los mismos, se concluye que las sustancias con una mayor prevalencia en todos los ámbitos temporales son el alcohol y el tabaco mientras que el cannabis se sitúa como la primera droga ilegal en cuanto a su prevalencia de consumo en el último año (9.6 %) seguido muy de lejos por la cocaína (2.3 %) las anfetaminas (0.6 %) y el éxtasis (0.7 %). Por tramos de edades, el consumo de cannabis se concentra entre los 15 y los 34 años, con una prevalencia de consumo alguna vez en la vida del 36.9 % frente a un 21.6 % en la franja de edad de 35 a 64 años. Además, es la sustancia ilícita de más pronto inicio en su consumo sólo superada por alcohol y tabaco con una edad media de iniciación en los 18.7 años y que casi no ha sufrido variaciones desde que se comenzaron a hacer registros (1995, 18.3 años). Además, su consumo se encuentra claramente diferenciado por sexos, donde la prevalencia de consumo en el último año para los hombres casi triplica a la de las mujeres (13.6 % frente al 5.5 %) [14].

1.1.2 ANFETAMINAS Y DERIVADOS SINTÉTICOS

1.1.2.A Aspectos generales

El término “anfetaminas” se usa de forma genérica para nombrar a dos compuestos: la anfetamina (AMP) y la metanfetamina (MAMP). La síntesis de AMP se produjo a finales del siglo XIX cuando se buscaba una alternativa sintética a la efedrina que era utilizada como tratamiento en personas asmáticas. Una vez conocidas sus propiedades estimulantes, los laboratorios clandestinos no dudaron en sintetizar nuevos compuestos análogos a las anfetaminas conocidos como “drogas de diseño”, en los que se potenciaban aún más sus efectos para ser utilizadas con fines recreativos. La “droga de diseño” más conocida es el éxtasis o metilendioximetanfetamina (MDMA) aunque actualmente la palabra éxtasis se aplica también a sus derivados: metilendioxianfetamina (MDA) y metilendioxietilanfetamina (MDEA). Estos compuestos (anfetaminas, éxtasis y similares) se suelen agrupar bajo el nombre de estimulantes de tipo anfetamínico (*amphetamine-type stimulants, ATS*).

Históricamente, Europa ha sido el continente donde se ha producido una mayor síntesis de ATS y la disponibilidad de AMP frente a otros ATS ha sido siempre mayor. En cuanto a los países de producción de AMP cabe destacar los Países Bajos, Bélgica, Bulgaria, Turquía, Polonia, Lituania y a menor escala Alemania, Hungría y Eslovenia. La MAMP ha tenido como principales centros de producción Polonia y Lituania junto con la República Checa y Alemania. De nuevo, los Países Bajos y Bélgica se han consolidado como los mayores productores de MDMA [12, 15].

El uso terapéutico de las anfetaminas está descrito contra la narcolepsia y como supresor del apetito. Ligeras modificaciones de su estructura han dado lugar a medicamentos como el metilfenidato (MPHEN) cuyo uso está descrito para tratar trastornos de déficit de atención e hiperactividad (*Attention deficit/hyperactivity disorder, ADHD*) y cuya descripción más extensa se encuentra en el apartado 1.2.1 de esta Tesis. Por otra parte, en la actualidad no se ha reconocido ningún uso farmacológico para el éxtasis y sus derivados [16-18].

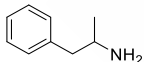
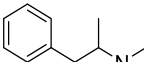
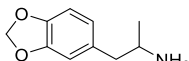
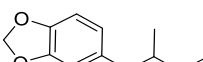
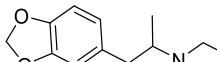
Los ATS son considerados estimulantes del sistema nervioso central y en su mecanismo de acción están involucradas la dopamina, serotonina y catecolamina aunque resulta complicado conocerlo en profundidad. Su presentación es en forma de pastillas con símbolos diversos o polvo de diferentes colores y su ingesta se produce vía nasal (esnifada) u oral. Entre sus principales efectos secundarios se encuentran un incremento en el nivel de alerta y en la capacidad de concentración, disminución de las sensaciones de cansancio, sueño y hambre, dilatación de las pupilas, sensaciones de bienestar y alucinaciones. Todos estos efectos pueden verse incrementados cuando su consumo se realiza junto con otras drogas o alcohol. Por ello el mayor consumo de ATS se ha asociado principalmente a ambientes nocturnos y música electrónica [16-18].

1.1.2.B Estructura y propiedades

Los ATS se consideran derivados de la fenetilamina y en la tabla II.2 se recogen algunas de las propiedades más significativas para estos compuestos. Los ATS presentan un carbono quiral, siendo el isómero S el de mayor potencia, aunque en su síntesis a partir de efedrina se obtiene una mezcla racémica. Se trata de compuestos polares y básicos

debido a la presencia de una amina primaria o secundaria en su estructura y en el medio ambiente se encuentran en forma protonada ya que para todos ellos el pK_a del grupo amino se encuentra por encima del pH natural de las aguas. Además tienen muy poca afinidad a adsorberse sobre la materia orgánica debido a su bajo log D a pH 7 (entre -0.3 y -1.1). Por otra parte la presión de vapor de las anfetaminas es moderada (0.15 - 0.3) con lo que podrían ser detectadas en el medio gaseoso o usando técnicas de extracción basadas en el espacio de cabeza. Sin embargo, la presencia de un grupo 3,4-metilendioxi para el resto de ATS hace que su volatilidad disminuya considerablemente (alrededor de mil veces menor que para las anfetaminas) lo que hace que difícil llevar a cabo las anteriores propuestas de extracción.

Tabla II.2. Estructura y principales propiedades fisicoquímicas de los ATS recogidos en esta Tesis. Valores estimados de pK_a (correspondiente al grupo básico), log D, log K_{ow} y P_{vapor} recogidos en la base de datos Scifinder [7]. MW: peso molecular. P_{vapor} : Presión de vapor.

Compuesto	Estructura	Fórmula	MW	CAS	pK_a	log D (pH=7, 25 °C)	log K_{ow}	$P_{vapor}/$ torr
AMP		$C_9H_{13}N$	135.2	300-62-9	9.9	-0.9	1.8	0.31
MAMP		$C_{10}H_{15}N$	149.2	537-46-2	10.4	-0.7	2.2	0.15
MDA		$C_{10}H_{13}NO_2$	179.2	4764-17-4	9.9	-1.1	1.6	3.5×10^{-3}
MDMA		$C_{11}H_{15}NO_2$	193.2	42542-10-9	10.3	-0.8	2.0	3.2×10^{-3}
MDEA		$C_{12}H_{17}NO_2$	207.3	82801-81-8	10.3	-0.3	2.6	1.2×10^{-3}

1.1.2.C Metabolismo

Los efectos de los ATS comienzan a los treinta minutos de ser consumidos y pueden durar horas. Se excretan mayoritariamente a través de la orina, tanto en forma de molécula sin modificar como de metabolito todavía activo. Por ejemplo, el porcentaje de AMP excretada sin metabolizar se encuentra en torno a un 30 % en las primeras 24 horas, aunque puede incrementarse hasta un 74 % en condiciones ácidas o reducirse

hasta un 1-2 % si el pH de la orina es muy básico. También su vida media en el organismo depende del pH oscilando entre las 7 y las 34 horas. El mismo comportamiento pH-dependiente puede observarse para la MAMP ya que en condiciones normales alrededor del 43 % de una dosis se excreta sin modificaciones en las primeras 24 horas, entre un 4-7 % como AMP y un 15 % como 4-hidroximetanfetamina, mientras que en condiciones drásticas de pH la excreción puede oscilar entre un 2-76 % para MAMP y 0.1-7 % para AMP. El tiempo de vida medio en el organismo es menor que para AMP (3-15 horas) aunque también depende de las condiciones de pH de la orina [8, 19]. Se cree que la MDA se excreta en una elevada proporción sin metabolizar ya que, aunque no existen datos sobre el metabolismo humano, las elevadas concentraciones detectadas en orina sugieren esta ruta. En el caso de la MDMA el 65 % de una dosis es excretada tal cual, mientras que un 7 % restante lo hace como MDA. Finalmente la droga que más cambios sufre cuando se elimina del organismo es la MDEA ya que sólo un 19 % de la dosis es excretada sin cambios mientras que un 28 % lo hace como MDA y un 32 % como 4-hidroximetoxietilamfetamina [8, 20].

1.1.2.D Consumo

Los ATS se encuentran entre los estimulantes de uso ilícito más consumidos en Europa. Los datos de prevalencia a nivel europeo recogidos por el EMCDDA muestran que aproximadamente 11.4 millones de adultos europeos (aprox. 3.4 % del total) declaran haber consumido anfetaminas (AMP y MAMP) alguna vez en su vida, mientras que el consumo de éxtasis y sustancias relacionadas (MDMA, MDA y MDEA) es un poco menor, con 10.6 millones de europeos (3.1 % de los adultos). En comparación con la cocaína, también considerada un estimulante ilícito, el patrón de consumo en Europa es muy diferente; si bien la cocaína tiene una prevalencia de consumo mayor en España, Reino Unido, Francia o Italia entre otros, la prevalencia para los ATS casi triplica a la de la cocaína en Polonia, Grecia, Bulgaria, República Checa, Eslovaquia y Portugal [12].

En líneas generales parece que el consumo de anfetaminas se ha visto reducido o estabilizado en el período 2007-2012. Datos del EMCDDA desglosados por países muestran que los valores de prevalencia de consumo en la vida más altos para la población general (15-64 años) se encuentran en el Reino Unido (10.6 %), Dinamarca (6.6

%) e Irlanda (4.5 %), mientras que la prevalencia en España se encuentra en torno a la media europea (3.3 % frente al 3.4 %) y al mismo nivel que Alemania (3.1 %), los Países Bajos (3.1 %) y Polonia (2.9 %). El éxtasis ha seguido la misma tendencia que las anfetaminas en cuanto a la estabilización en su consumo, a excepción de Bulgaria donde sigue al alza, mostrando una prevalencia de consumo anual en los jóvenes de este país (15-34 años) en torno al 2.9 % (1 % para la media Europea). Por países, el Reino Unido (8.3 %), Irlanda (6.9 %) y los Países Bajos (6.2 %) son los que presentan una prevalencia de consumo anual para la población entre los 15 y 64 años más alta, mientras que España vuelve a situarse en torno a la media de la Unión Europea (3.6 % frente al 3.1 %) [12].

En España la encuesta EDADES y el informe REITOX (datos de 2011) posicionan a los ATS como la tercera droga ilegal en cuanto a su prevalencia de consumo anual para la población general (0.6 % para anfetaminas, 0.7 % para éxtasis y sus derivados), prácticamente al mismo nivel que las “setas mágicas” y otros alucinógenos (0.4 %) y por detrás del cannabis (9.6 %) y la cocaína (2.2 %). Además, el consumo de ATS ha disminuído de forma considerable desde que en 2001 alcanzara su máximo histórico (1.1 % para anfetaminas y 1.8 % para éxtasis) siguiendo la misma tendencia que en el resto de Europa. La franja de edad en la que se observa una mayor prevalencia de consumo en la vida es entre 15 y 34 años (4.6 % para anfetaminas, 5.7 % para éxtasis) ya que ésta multiplica por dos a la prevalencia observada en la franja 34-65 años (2.4 % para anfetaminas, 2.3 % para éxtasis). Esta diferencia se incrementa hasta cinco veces más si comparamos la prevalencia de consumo anual (1 % para anfetaminas y éxtasis en la franja de 15 a 34 años frente al 0.2 % entre los 34 y 65 años).

El inicio en el consumo de anfetaminas se ha retrasado 2 años desde que se registrara el valor más bajo (18.8 años, 2001), aunque para el éxtasis ha permanecido prácticamente constante desde 1995 (21.1 años) por lo que se puede concluir que la edad a la que los jóvenes prueban por primera vez los ATS es alrededor de los 20 años, al igual que para la cocaína (21 años), los inhalables volátiles (19.7 años), la heroína (20.7 años) y otros alucinógenos (20.5 años) [13, 14]. Al igual que ocurre para las demás drogas de abuso, el consumo de ATS por sexos está claramente diferenciado con un porcentaje

masculino (0.9 % para anfetaminas, 1 % para éxtasis) que casi triplica al femenino (0.3 % para anfetaminas, 0.4 % para éxtasis) en base a la prevalencia de consumo anual.

1.1.3 ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS A TRAVÉS DEL AGUA RESIDUAL

Como ya se ha mencionado en los apartados correspondientes (ver secciones 1.1.1.D y 1.1.2.D), la manera más habitual de obtener información sobre el consumo de drogas consiste en la realización de encuestas sobre una muestra representativa de la población a través de diferentes organismos tanto a nivel nacional como internacional [21-23]. Los datos de las estadísticas junto con los de producción, decomisos, incautaciones, historiales médicos y datos criminológicos permiten obtener una estimación bastante cercana a la realidad del consumo de drogas de abuso en una determinada región. Estos datos se publican de forma continuada en informes que muestran las tendencias de consumo y las pautas futuras a seguir [12, 14]. Entre los principales inconvenientes de esta metodología destaca el gran volumen de datos que hace que el trabajo se convierta en algo tedioso y largo con lo que los resultados suelen ser publicados con varios años de retraso, pudiendo pasar desapercibidos ciertos consumos puntuales e imposibilitando la detección de cambios a tiempo real. Además, existen ciertas comunidades que por su naturaleza pueden pasar inadvertidas para los encuestadores.

Como alternativa, en 2001 Christian G. Daughton propuso una metodología que años más tarde sería bautizada como “*wastewater-based epidemiology*” o “estudios epidemiológicos a través del análisis de agua residual”, en la que se planteaba obtener datos sobre el consumo de drogas de abuso a través del análisis de los metabolitos que excreta el cuerpo humano cuando se consumen estas sustancias [24]. Estos metabolitos podrían ser detectados en el agua residual que llega a las plantas de tratamiento de agua residual (*wastewater treatment plants, WWTPs*) y de esta forma se podrían obtener datos rápidos y objetivos, pudiendo centrarse en determinadas poblaciones y fechas concretas. Esta teoría se materializó en 2005 cuando Zuccato et al. [25] sentaron las bases para su desarrollo, estimando el consumo de cocaína en diferentes ciudades de Italia a partir de la concentración de su principal metabolito humano, la benzoilecgonina presente en el agua residual. A partir de ese momento se convirtieron en el grupo pionero en el

desarrollo de metodologías para la detección de drogas en agua residual aplicándolo más tarde a cannabis (THC), ATS y opiáceos. Hoy en día existen otros grupos de investigación que emplean esta técnica para evaluar el consumo de drogas a través de la cuantificación de sus metabolitos en agua [26-31] y actualmente está siendo evaluada por el EMCDDA [32].

No obstante, esta metodología no está exenta de complicaciones y existen diferentes publicaciones en las que se pone de manifiesto sus principales carencias o mejoras a realizar [33-38], entre las más importantes cabría destacar que los porcentajes de excreción pueden variar dependiendo de la edad, la vía de administración o la presencia de otras sustancias en el cuerpo. Además, el número de usuarios de la WWTP puede variar significativamente y en la misma se pueden producir pérdidas de muestra, procesos de adsorción o degradación de los analitos con los que se puede producir una subestimación de su concentración. Debido a todas estas razones, no se plantean los estudios epidemiológicos a través del análisis de agua residual como una alternativa, sino más bien como un método complementario a los ya existentes. A continuación en la figura II.1 se describe el flujo de trabajo que se lleva a cabo para la aplicación de esta metodología.

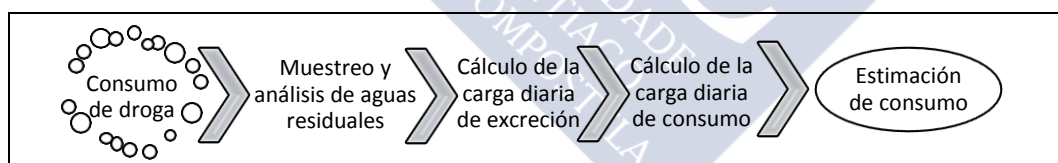


Figura II.1. Flujo de trabajo empleado en los estudios epidemiológicos a través del análisis de agua residual

El proceso analítico comienza con el muestreo usando un tomamuestras automático que permita la recogida de agua a la entrada de la WWTP (influyente) de forma representativa (proporcionalmente al tiempo o al caudal de entrada) durante la jornada de muestreo (habitualmente 24 horas). A continuación, se calcula la concentración de la sustancia empleada como biomarcador. El biomarcador ideal (ver tabla II.3) es aquel que es estable en agua y exclusivo de una única sustancia, como ocurre por ejemplo con la benzoilecgonina para la cocaína. Sin embargo, en el caso de la heroína, el uso de su principal metabolito (morfina) como biomarcador no asegura la exclusividad ya que la morfina es un compuesto en sí mismo susceptible de consumo y a su vez metabolito de

la codeína. Como se puede observar en la tabla II.3 los ATS se excretan en una amplia proporción sin modificar por lo que el biomarcador que se monitoriza es la propia droga de abuso. No obstante, la AMP también es un metabolito de la MAMP y ambas (AMP y MAMP) son metabolitos de otros fármacos con lo que el uso de estos biomarcadores puede conducir a sobreestimaciones en el consumo [33].

A continuación, la concentración del biomarcador detectada en el influente se transforma en carga diaria de excreción al multiplicarla por el caudal diario de agua que recibe la depuradora. Una vez obtenida la carga diaria de excreción de biomarcador, se transforma en carga diaria de consumo de droga en el área que abastece la depuradora. Para ello se emplea un factor de corrección (CF) que se calcula empleando la ecuación II.1 en la que se tiene en cuenta el peso molecular de la droga (MW_{droga}), el peso molecular del biomarcador ($MW_{\text{biomarcador}}$) y la fracción molar de droga excretada como biomarcador (ver tabla II.3) [10].

Tabla II.3. Principales biomarcadores empleados para las drogas de abuso detectadas en agua y factores de corrección usados en los estudios epidemiológicos a través del estudio de aguas residuales. MW: peso molecular, CF: factor de corrección.

Droga	Biomarcador	% Droga excretada como biomarcador	$MW_{\text{droga}}/MW_{\text{biomarcador}}$	CF
AMP	AMP	30	1.00	3.3
MAMP	MAMP	43	1.00	2.3
MDMA	MDMA	65	1.00	1.5
THC	THCCOOH	0.6	0.91	151.7
Cocaína	Benzoilecgonina	45	1.05	2.3
	Cocaína	10	1.00	10.0
Heroína	Morfina	42	1.29	3.1
	6-Acetilmorfina	1.3	1.13	86.9

$$CF = \frac{MW_{\text{droga}}/MW_{\text{biomarcador}}}{\text{Fracción molar de droga excretada como biomarcador}} \quad [\text{Ec. II.1}]$$

Normalmente, el consumo de droga se expresa como mg de sustancia por día y por cada mil habitantes, por lo que la carga de consumo debe ser dividida por el número de usuarios a los que abastece la depuradora con lo que finalmente la ecuación para el cálculo de consumo es la que se recoge en la Ec. II.2.

$$\text{Consumo}_{\text{sustancia}} (\text{mg día}^{-1} 1000 \text{ hab}^{-1}) = \text{concentración}_{\text{biomarcador}} (\text{mg L}^{-1}) \\ \times \text{caudal}_{\text{WWTP}} (\text{L día}^{-1}) \times \text{CF} \times (1000 \text{ hab/número usuarios WWTP}) \quad [\text{Ec. II.2}]$$

El consumo de drogas también se puede expresar en forma de dosis por cada mil habitantes y en ese caso sólo quedaría dividir el resultado de la ecuación II.2 entre los gramos que contiene una dosis. Debido a que existe cierta controversia sobre la conversión entre gramos y dosis (ya que los gramos que constituyen una dosis oscilan dependiendo del país o de la forma de ingesta), la forma más aceptada es la expresada en forma de $\text{mg día}^{-1} 1000 \text{ habitantes}^{-1}$ [10].

1.1.3.A Aplicaciones de los estudios epidemiológicos a través del agua residual a los analitos estudiados

Dos de los estudios más completos en este campo han sido los coordinados por Kevin V. Thomas en colaboración con diferentes instituciones y grupos de investigación. En ellos se evaluó el consumo de drogas de abuso de forma simultánea durante una semana entre los años 2011 y 2013 en un máximo de 42 ciudades pertenecientes a la Unión Europea [11, 39]. Las muestras integradas (24 horas) se analizaban diariamente durante una semana y se obtenían las cargas de consumo de THC, ATS y cocaína en cada ciudad. Los datos obtenidos revelaron diferentes patrones de consumo en Europa, tanto a nivel temporal como espacial. Así en 2011, el consumo estimado para THC fue similar en toda Europa ($14\text{-}124 \text{ mg día}^{-1} 1000 \text{ habitantes}^{-1}$). En cuanto al consumo de ATS, los países que mostraron un predominio de AMP sobre MAMP fueron España, Suecia, Reino Unido, Bélgica y los Países Bajos mientras que los países Nórdicos destacaron por sus elevados valores para MAMP ($175\text{-}300 \text{ mg día}^{-1} 1000 \text{ habitantes}^{-1}$). En cuando al consumo de MDMA destacaron los Países Bajos y Reino Unido con 32 y $615 \text{ mg día}^{-1} 1000 \text{ habitantes}^{-1}$ respectivamente. Además, para este último compuesto se observó un incremento sustancial en sus cargas de consumo durante el fin de semana. En general, los datos observados mostraron una tendencia estable durante el período estudiado, a excepción de una disminución en el consumo de MAMP en 2012. Además, la concordancia con los datos de prevalencia proporcionados por las estadísticas oficiales fue bastante elevada. La misma metodología ha sido aplicada con éxito de forma aislada a otras sustancias adictivas como el alcohol [40-42] y el tabaco [43, 44].

1.2 FÁRMACOS

Según la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*United States Food and Drug Administration, FDA*) [45] un fármaco es “cualquier sustancia reconocida por la farmacopea o cualquier otro organismo oficial que se usa para la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación y/o cura de enfermedades”. En España el organismo encargado de regular, autorizar y supervisar los fármacos es la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) dependiente del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

La WHO ha diseñado el Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química (*anatomical, therapeutical and chemical classification system, ATC*) a través del cual los fármacos son organizados en diferentes grupos terapéuticos [46]. El sistema ATC ha sido adoptado en todo el mundo y está estructurado en base a una serie de letras y números que identifica a cada fármaco dentro de un grupo específico. Así, el sistema comienza con una letra que clasifica a los fármacos en catorce grupos acorde a su nivel anatómico de actuación, como se puede observar en la figura II.2 que recoge la clasificación ATC para los fármacos estudiados en esta Tesis. A continuación de la letra se colocan un número de dos cifras que identifica el subgrupo terapéutico y dos letras que identifican el subgrupo farmacológico y químico.

El último informe anual del Sistema Nacional de Salud publicado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad revela que el número de recetas generadas en 2012 asciende a 913 millones lo que supuso un cargo a fondos públicos de casi 10.000 millones de euros observándose una clara disminución respecto a los años anteriores (un 20 % menos de gasto respecto a 2010). Esto supone un gasto medio por receta de unos 10 euros [47]. Entre los grupos ATC de mayor consumo en 2010 se encuentran los fármacos para el tratamiento de alteraciones causadas por ácidos (A02), en particular los pertenecientes al grupo de los inhibidores de la bomba de protones (A02BC) con 68 millones de envases, seguido por los fármacos que reducen los lípidos séricos (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, C10AA) y los ansiolíticos del grupo N05BA con alrededor de 47 millones de envases ambos.

También destaca el consumo de analgésicos pertenecientes a la familia de las anilidas (N02BE) con 36 millones de envases y los antiinflamatorios derivados del ácido propiónico (grupo M01AE) con 32 millones de envases [48].

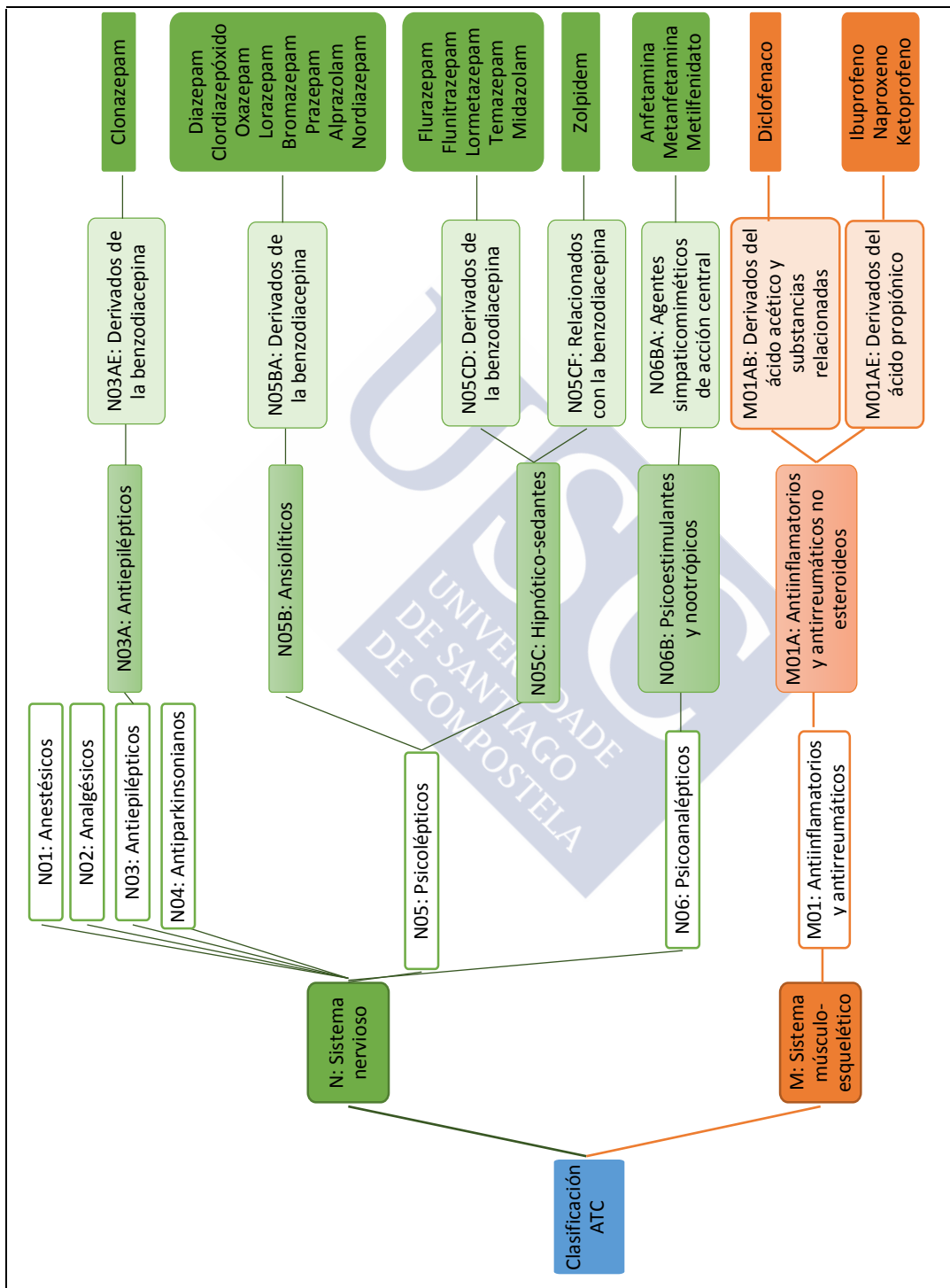


Figura II.2. Clasificación de los fármacos estudiados en esta Tesis según el sistema ATC.

El uso de medicamentos con fines recreacionales es conocido como “*pharming*” donde lo que se busca es exceder la dosis diaria recomendada buscando algunos de sus efectos secundarios. El “*pharming*” está cobrando cada vez más importancia debido al fácil acceso a los fármacos, muchas veces dispensados sin receta o incluso comprados en internet. Erróneamente se cree que el consumo abusivo de fármacos es menos dañino que en el caso de drogas ilegales compradas en la calle, ya que se trata de sustancias legales que siguen un estricto control de producción y calidad [49].

En los últimos años la Red Norteamericana de Alerta sobre Abuso de Drogas (*Drug Abuse Warning Network, DAWN*) ha publicado un incremento notable en las visitas a urgencias de los centros hospitalarios de Estados Unidos relacionadas con los efectos secundarios y un uso inapropiado de fármacos. Evaluando dichas visitas se observó que las relacionadas con los efectos del zolpidem (ZOLP) han aumentado un 220 % desde 2005 hasta 2010 y en el 50 % de los casos estaban presentes otros fármacos como narcóticos, ansiolíticos y otros somníferos [50]. Las relacionadas con los efectos adversos del MPHEN se incrementaron un 58 % donde en un 21 % de los casos estaban presentes drogas de abuso y en un 19 %, el alcohol. Además, más de un tercio de las visitas a urgencias estaban relacionadas con el abuso de fármacos pertenecían a la familia de las benzodiacepinas, fundamentalmente alprazolam (ALP) clonazepam (CLON) y lorazepam (LOR) [51, 52].

A continuación se procede a describir las principales características físico-químicas de los fármacos estudiados en esta Tesis así como algunos de los aspectos más relevantes de su metabolismo y consumo.

1.2.1 BENZODIACEPINAS, ZOLPIDEM Y METILFENIDATO

1.2.1.A Aspectos generales

Las benzodiacepinas (BZPs) son un amplio grupo de fármacos relacionados estructuralmente con propiedades hipnótico-sedantes, ansiolíticas, relajantes musculares y antiepilépticas. Según la clasificación ATC, las BZPs pertenecen a los grupos N05B y N05C a excepción del CLON que es la única benzodiacepina que forma parte del grupo N03A (antiepilépticos), ver figura II.2. Las BZPs basan su principal efecto en aumentar la presencia de ácido gamma-aminobutírico (*Gamma-aminobutyric acid, GABA*) en el

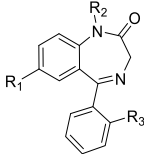
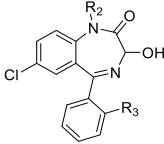
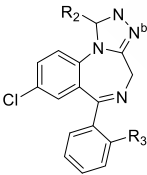
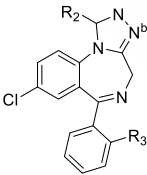
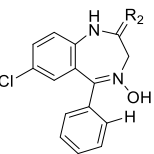
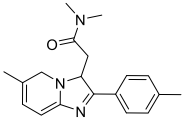
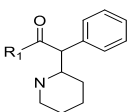
espacio extraneuronal, un importante inhibidor de la neurotransmisión. De esta forma el consumo de BZPs produce un alto grado de relajación al interrumpirse o disminuir la velocidad con la que las neuronas transmiten sus estímulos. Por lo tanto, las BZPs se recetan en situaciones de dependencia farmacéutica, estados de euforia, insomnio o para calmar la ansiedad siendo la vía oral la forma de administración más común aunque también pueden ser administradas por vía parenteral [53, 54]. Cuando se produce una interrupción brusca del tratamiento con estos fármacos se produce un síndrome de abstinencia que puede llegar a durar seis meses o más por lo que los médicos aconsejan una lenta deshabitación [55, 56]. Además, debido al bienestar asociado a su consumo es muy posible sufrir un elevado grado de dependencia que puede conllevar un consumo ilícito y sin control médico. Por otra parte, los efectos secundarios derivados de dosis elevadas parecen estar detrás de un consumo inadecuado de alguno de estos fármacos o con fines poco lícitos como robos o abusos [57].

El ZOLP pese a no ser considerado una BZP se engloba dentro del mismo grupo terapéutico que ellas (N05C, hipnótico-sedantes) ya que posee una estructura imidazopiridínica similar (ver tabla II.4) y en su mecanismo de acción está involucrado también el receptor GABA. A diferencia de otras BZPs, el ZOLP no tiene propiedades miorrelajantes por lo que su utilización se emplea mayoritariamente para controlar el mecanismo del sueño de forma esporádica y durante un corto espacio de tiempo [58, 59]. Aunque en un primer momento se pensó que no creaba una situación de dependencia, la FDA recomendó bajar la dosis habitual para evitar la somnolencia y el efecto “rebote” al día siguiente [60]. Algunos estudios indican que el consumo de ZOLP produce un efecto más similar a las drogas de abuso que otro tipo de hipnóticos [61, 62], además las personas con problemas de alcoholismo o adicciones a drogas ilegales parecen ser más propensas a abusar de este medicamento [62].

El MPHEN fue sintetizado en 1944 bajo el nombre de “*Ritalin*” y se utiliza como estimulante del sistema nervioso central (grupo ATC N06B, psicoestimulantes y nootrópicos) para tratar la fatiga crónica, letargia, estados depresivos, conducta senil perturbada, psicosis asociada a depresión y narcolepsia [63].

Tabla II.4. Estructura química de las benzodiazepinas y compuestos relacionados estudiados en esta Tesis.

^a Metabolitos humanos. ^b Posición ocupada por un carbono en el caso de MID.

Estructura	Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
	Nordiazepam (NDIA)	Cl	H	H
	Clonazepam (CLON)	NO ₂	H	Cl
	Flunitrazepam (FLUN)	NO ₂	CH ₃	F
	7-Aminoclonazepam (7ACLON) ^a	NH ₂	H	Cl
	7-Aminoflunitrazepam (7AFLUN) ^a	NH ₂	CH ₃	F
	Diazepam (DIA)	Cl	CH ₃	H
	Flurazepam (FLUR)	Cl	CH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂	F
	2-hidroxiethylflurazepam (2HEFLU) ^a	Cl	CH ₂ CH ₂ OH	F
	Prazepam (PRA)	Cl	CH ₂ CHCH ₂ CH ₂	H
	Oxazepam (OXA)	-	H	H
	Lorazepam (LOR)	-	H	Cl
	Temazepam (TEM)	-	CH ₃	H
	Lormetazepam (LORM)	-	CH ₃	Cl
	Alprazolam (ALP)	-	CH ₃	H
	α-Hidroxi alprazolam (AHALP) ^a	-	CH ₂ OH	H
	Midazolam (MID)	-	CH ₃	F
	α-Hidroxitriazolam (AHTRI) ^a	-	CH ₂ OH	Cl
	Clordiazepóxido (CHLOR)	-	NCH ₃	-
	Demoxepam (DEM) ^a	-	O	-
	Bromazepam (BROM)	-	-	-
	Zolpidem (ZOLP)	-	-	-
	Metilfenidato (MPHEN)	OCH ₃	-	-
	Ácido ritalínico (RIT) ^a	OH	-	-

A día de hoy en España, su uso está restringido al tratamiento de ADHD en niños mayores de 6 años y adolescentes, cuando otros fármacos no son eficaces [64]. Su mecanismo de acción específico no se conoce con precisión, pero podría estar involucrado en la recaptación de noradrenalina y dopamina modificando la concentración de ambos neurotransmisores en el espacio extraneuronal por lo que los efectos secundarios están relacionados con la aparición de alucinaciones, paranoia, euforia y trastorno delirante muy similares a los que producen los ATS ya que comparten la misma estructura derivada de la fenetilamina. Sin embargo, se trata de un estimulante bajo control médico del que no se ha reportado un consumo ilícito masivo hasta el momento aunque se cree que los adolescentes pueden llegar a abusar de este medicamento por diferentes motivos como por ejemplo la ayuda para concentrarse en los estudios y para incrementar su estado de alerta y euforia [49, 65-67].

1.2.1.B Estructura y propiedades

El núcleo común de todas las BZPs es un anillo bencénico unido a un grupo 1,4-diacepina que se conoce como grupo benzodiazepínico, sin embargo todas las BZPs de relevancia farmacológica poseen un grupo arilo en el carbono 5 del anillo 1,4-diacepina por lo que muchas veces se suele nombrar benzodiazepina a todo el conjunto de tres miembros (anillo bencénico, grupo 1,4-diacepina y sustituyente 5-arilo). Según los sustituyentes que se encuentren presentes se obtienen diferentes compuestos con distintas funcionalidades, así en la tabla II.4 se recogen las estructuras de las benzodiazepinas y algunos de sus metabolitos humanos más representativos que han sido estudiadas en esta Tesis y a continuación en la tabla II.5 sus propiedades físicoquímicas más relevantes.

Se puede observar que flunitrazepam (FLUN), 7-aminoflunitrazepam (7AFLUN), diazepam (DIA), flurazepam (FLUR), prazepam (PRA), ALP, midazolam (MID), clordiazepóxido (CHLOR), MPHEN y ZOLP presentan un nitrógeno básico en su estructura y dependiendo de su valor de pK_a se encontrarán en el medio acuoso en forma neutra o cargada. Así, FLUN, 7AFLUN, DIA, PRA, ALP y CHLOR poseen un pK_a inferior al de las aguas naturales y se encontrarán en el medio en su forma neutra mayoritariamente, mientras que MID y ZOLP (que presentan un pK_a para el grupo básico en torno a 6-7) se encontrarán en las

muestras acuosas parcialmente ionizados. Finalmente FLUR y MPHEN son los compuestos más básicos de todos los recogidos en esta selección (pK_a del grupo básico mayor que 9) por lo tanto se encontrarán cargados positivamente en el medio acuoso al igual que ocurría con los ATS.

Tabla II.5. Propiedades físicoquímicas de las BZPs estudiadas, ZOLP y MPHEN. Valores estimados de pK_a (protón más ácido/protón más básico), log D, log K_{ow} y P_{vapor} recogidos en la base de datos Scifinder [7] excepto ^a que se obtuvo de la base de datos Physprop [68]. MW: peso molecular, P_{vapor} : Presión de vapor.

Compuesto	Formula	MW	CAS	pK_a	log D (pH=7, 25 °C)	log K_{ow}	P_{vapor} /torr
NDIA	$C_{15}H_{11}ClN_2O$	270.7	1088-11-5	11.7/3.2	2.8	2.8	2.1×10^{-8}
CLON	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	315.7	1622-61-3	11.2/1.5	2.5	2.5	4.3×10^{-11}
FLUN	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	313.3	1622-62-4	-/1.7	2.1	2.1	9.1×10^{-12}
7ACLON	$C_{15}H_{12}ClN_3O$	285.7	4959-17-5	12.1/3.8	1.3	1.3	4.7×10^{-11}
7AFLUN	$C_{16}H_{14}FN_3O$	283.3	34084-50-9	-/4.1	1.4	1.4	9.7×10^{-12}
DIA	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284.7	439-14-5	-/3.4	2.8	2.8	5.0×10^{-10}
FLUR	$C_{21}H_{23}ClFN_3O$	387.9	17617-23-1	-/9.8	2.2	4.8	3.3×10^{-12}
2HEFLU	$C_{17}H_{14}ClFN_2O_2$	332.8	20971-53-3	14.4/1.7	2.0	2.0	1.1×10^{-13}
PRA	$C_{19}H_{17}ClN_2O$	324.8	2955-38-6	-/3.5	3.7	3.7	1.1×10^{-11}
OXA	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	286.7	604-75-1	10.9/1.1	2.2	2.2	4.4×10^{-11}
LOR	$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$	321.2	846-49-1	10.8/0.2	2.4	2.4	3.2×10^{-12}
TEM	$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	300.7	846-50-4	11.7/1.6	2.2	2.2	6.3×10^{-13}
LORM	$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$	335.2	848-75-9	11.6/-0.07	2.4	2.3	4.2×10^{-14}
ALP	$C_{17}H_{13}ClN_4$	308.7	28981-97-7	-/2.4	1.9	1.9	1.8×10^{-10}
AHALP	$C_{17}H_{13}ClN_4O$	324.8	37115-43-8	12.9/1.5	0.6	0.6	3.3×10^{-13}
MID	$C_{18}H_{13}ClFN_3$	325.8	59467-70-8	-/6.0	3.8	3.8	5.2×10^{-10}
AHTRI	$C_{17}H_{12}Cl_2NO$	359.2	37115-45-0	12.9/1.4	0.8	0.8	2.2×10^{-14}
CHLOR	$C_{16}H_{14}ClN_3O$	300.0	58-25-3	-/2.4	2.5	2.5	4.2×10^{-12}
DEM	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	286.7	963-39-3	10.3/0.6	0.7	0.7	2.4×10^{-13a}
RIT	$C_{13}H_{17}NO_2$	219.1	19395-41-6	3.5/10.5	-0.6	1.9	4.7×10^{-6}
MPHEN	$C_{14}H_{19}NO_2$	233.3	113-45-1	-/9.5	-0.1	2.3	2.0×10^{-4}
BROM	$C_{14}H_{10}BrN_3O$	316.2	1812-30-2	11.4/2	2.3	2.3	8.9×10^{-10}
ZOLP	$C_{19}H_{21}N_3O$	307.4	82626-48-0	-/6.7	2.9	3.1	2.3×10^{-10a}

El resto de compuestos: nordiazepam (NDIA), CLON, 7-aminoclonazepam (7ACLON), 2-hidroxietilflurazepam (2HEFLU), oxazepam (OXA), LOR, temazepam (TEM), lormetazepam (LORM), α -hidroxialprazolam (AHALP), α -hidroxitriazolam (AHTRI),

demoxepam (DEM), bromazepam (BROM) y ácido ritalínico (RIT) se pueden considerar anfóteros al poder encontrarse cargadas negativa o positivamente dependiendo del pH. Sin embargo, todos ellos (a excepción del RIT) se encontrarán en el medio acuoso en su forma neutra al ser el pK_a del grupo ácido mayor de 7 (oscila entre 10 y 14) y el pK_a del grupo básico menor que el de las aguas naturales (oscila entre 1 y 4).

Especial consideración tiene el RIT (principal metabolito del MPHEN) puesto que se trata del único compuesto carboxílico que se ha incluido. En su estructura confluyen un grupo ácido (grupo carboxílico) y un grupo básico (una amina secundaria en forma de anillo piperidínico) por lo que pH inferiores a 3.5 darán lugar a que predomine la molécula con una carga positiva (resultado de la protonación del anillo piperidínico) mientras que pH superiores a 10.5 el compuesto se encontrará con una carga global negativa debido a la desprotonación del grupo carboxílico. Entre estos dos valores de pH el RIT se encontrará con una carga neta igual a cero. Las BZPs, MPHEN, RIT y ZOLP son compuestos polares con poca tendencia a ser adsorbidos sobre la materia orgánica con log D a pH 7 no superiores a 3, excepto para PRA y MID cuyo log D está muy próximo a 4 (ver tabla II.5). Estos valores son similares a los del THCCOOH (log D a pH 7 = 2.9) con lo que su tendencia a la adsorción sobre la materia orgánica sería similar. Por otra parte, sus presiones de vapor son muy bajas con lo que se caracterizan por una escasa volatilidad.

1.2.1.C Metabolismo

La metabolización de las BZPs y compuestos relacionados ocurre en el hígado a través del sistema microsomal en dos fases. Algunos de los metabolitos más importantes y datos de interés metabólico se recogen en la tabla II.6. En la primera fase del metabolismo se lleva a cabo una reacción de oxidación (una hidroxilación en la posición 3 para las triazolobenzodiazepinas: ALP, MID, BROM o PRA entre otras), una N-dealquilación (DIA, DEM) o una reducción (CLON y FLUN). Este proceso se lleva a cabo a través del complejo enzimático del citocromo P450. En esta primera etapa se pueden producir metabolitos que todavía son activos farmacológicamente como es el caso del NDIA (DIA N-dealquilado).

Tabla II.6. Recopilación de datos metabólicos y porcentajes de excreción para las BZPs y compuestos relacionados estudiados en esta Tesis. La tabla ha sido elaborada a partir de los datos de Moffat et al. [19] y Baselt [8] excepto para ^a que son los recogidos en un estudio realizado por Luk et al. [69]. ^b Excretado a través de las heces.

Comp.	% Eliminación de una dosis, tiempo		Compuestos detectados en orina	
	en orina	en heces	% Fármaco excretado sin modificar o como glucurónido	Metabolitos mayoritarios (%)
CLON	<0.5-1, 1 d 70, 7 d	-	<0.5-1	7ACLON y 7-acetamidoCLON (50)
NDIA	-	-	-	OXA
FLUN	8, 7 d	10-11, 7 d	<1	7AFLUN (10), 3-hidroxiFLUN (3,5)
DIA	-	1-10	trazas	NDIA (17) ^a OXA (33) ^a TEM (50) ^a
FLUR	60, 48 h	8-9	trazas	2HEFLU (29-55) N-desalquil-3-hidroxiFLUR (1-4)
PRA	38, 48 h 60, 7 d	7, 48 h	trazas	OXA (30-59) 3-hidroxiPRA (3-35) NDIA (trazas)
OXA	70-80, 72 h	10	70-100	Derivados hidroxilados (5)
LOR	>50, 24 h 75, 5 d	7	trazas-75	Metabolitos hidroxilados y derivados de la quinazolina (14)
TEM	80-82	12	<2-75	OXA (trazas-6)
LORM	80, 72 h		80	LOR (6)
ALP	80, 72 h	7, 72h	11-22	AHALP (15-17) metabolito derivado de benzofenona (9-17)
MID	90, 24 h		<1	1-hidroximetilMID (60-70) 4-hidroxiMID
CHLOR	60	10-20	<1	DEM (6) OXA NDIA otros derivados hidroxilados
DEM	10, 24 h 60, 7 d	15, 7d	27	OXA (5) NDIA ^b (2)
BROM	70, 72 h	-	2	2-amino-5-bromo-3-hidroxibenzoilpiridina (40) 3-hidroxiBROM (27)
ZOLP	47-67, 4 d	29-42, 4 d	<1	Derivados oxidados e hidroxilados (6-48)
MPHEN	80, 24 h	-	trazas	RIT (60-81) Ácido-6-oxo- α -fenilpiperidin-2-acético (5-12)

La segunda etapa consiste en una conjugación de los derivados hidroxilados y aminados con el ácido glucurónico para formar complejos inactivos muy hidrosolubles y rápidamente eliminados a través de la orina. Según el compuesto del que se trate no todos necesitan pasar por las dos fases del metabolismo, sino que algunos son metabolizados rápidamente ya que sólo precisan de la primera (ALP) o de la segunda (LOR u OXA) fase. El ZOLP y MPHEN son intensamente metabolizados, dando lugar a metabolitos sin actividad farmacológica, que son eliminados con la orina y heces a través de derivados carboxilados empleando una oxidación fenólica (ZOLP) o una hidrólisis del enlace ester (MPHEN) [8, 19, 70].

Las BZPs se pueden clasificar según su semivida plasmática, siendo de vida corta aquellas que con una semivida plasmática inferior a 8 horas (MID, ZOLP), de acción intermedia las que su semivida plasmática oscile entre 8 y 24 horas (FLUN, LORM, TEM, ALP, OXA, BROM y LOR) y de acción larga las superiores a 24 horas (DIA, PRA, CHLOR, FLUR).

1.2.1.D Consumo

A la hora de evaluar el consumo de fármacos la aproximación más correcta es emplear el número de unidades vendidas a pesar de que se pueda producir una ligera sobreestimación, ya que muchas veces no se consumen todas las dosis que se han prescrito [71]. A la vista del trabajo publicado en 2012 por Simó Miñana [72] elaborado a partir de los datos de Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (*Organization for Economic Co-operation and Development, OECD*) se observa que el consumo de ansiolíticos (grupo N05B) en España durante el período 2000-2007 se encuentra por encima de la media europea (43 DHD¹ frente a 31.4 DHD) siendo sólo superado por Francia (57.4 DHD) y Luxemburgo (47.2 DHD), mientras que el consumo de hipnótico-sedantes (grupo N05C) es un poco inferior a la media europea (21 DHD frente

¹ DHD: Dosis Diaria Definida (DDD) por 1000 habitantes y por día. La DDD es la unidad técnica de medida y comparación que equivale a la dosis media diaria de mantenimiento cuando se utiliza en su indicación principal, por una vía de administración determinada, expresada en cantidad de principio activo.

a 28.9 DHD), siendo Islandia (62.6 DHD), Finlandia (53.4 DHD), Luxemburgo (51.9 DHD) y Suecia (47.9 DHD) los que han publicado una mayor DHD. Por otra parte, la tendencia en España es un ascenso constante en el consumo de ansiolíticos e hipnótico-sedantes como se viene observando desde el año 2000 y que se recoge en la figura II.3.

Según el informe publicado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y la AEMPS los ansiolíticos más consumidos en España durante el 2012 han sido LOR, ALP y DIA (22.0, 16.8 y 7.8 DHD respectivamente, ver figura II.4A) seguidos muy de lejos por el resto de principios activos, además han sido los que han demostrado un mayor incremento durante el período 2000-2012. En el apartado de hipnótico-sedantes, los más consumidos en 2012 han sido el LORM y ZOLP (20.3 y 8.0 DHD respectivamente, ver figura II.4B) y también los que mayor incremento sufrieron en su consumo en el período estudiado (126 % y 98 % respectivamente). Atendiendo a su vida plasmática media los de vida intermedia (10-24 horas) han sido con diferencia los más consumidos con casi 70 DHD frente a valores inferiores a 20 DHD para el caso de los de vida larga y corta [73, 74].

La encuesta EDADES comenzó a monitorizar el consumo de hipnótico-sedantes en el año 2005 y su prevalencia anual era del 5 %. Sin embargo, el último informe publicado (año 2011) muestra una tendencia ascendente en los últimos cinco años con una prevalencia de consumo en el último año del 11.4 % en la población general, por delante del consumo de cannabis (9.6 %) y solo por detrás del tabaco y alcohol.

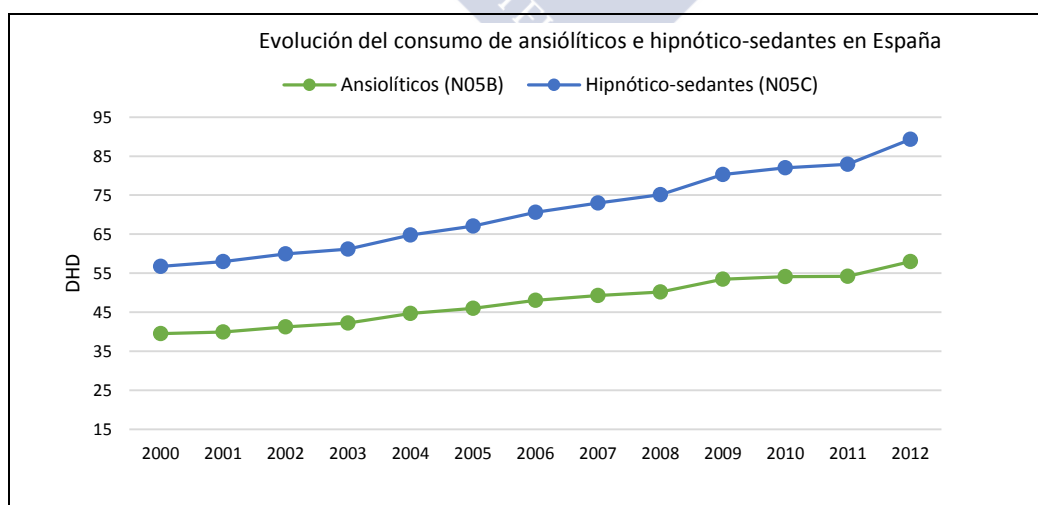


Figura II.3. Consumo de ansiolíticos e hipnótico-sedantes en España calculado a partir de las unidades vendidas. Fuente: elaboración propia a partir de los datos disponibles en la AEMPS [73].

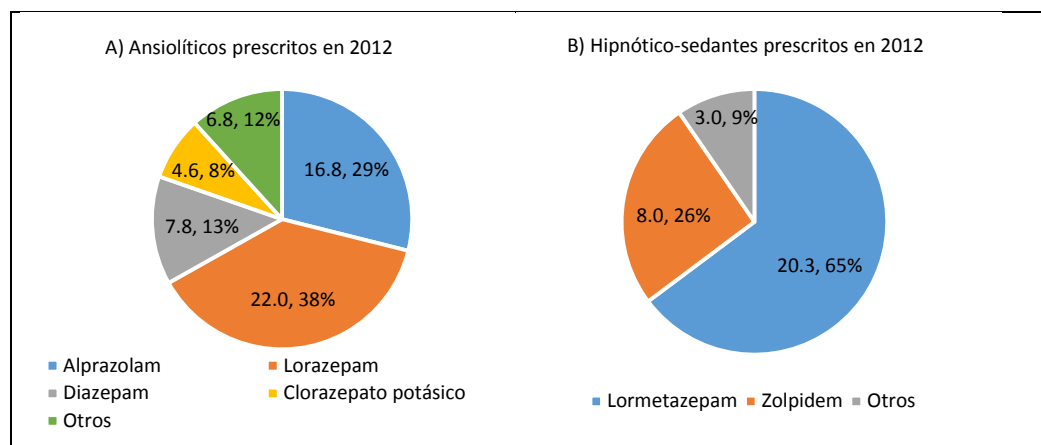


Figura II.4. Desglose por principio activo del total de ansiolíticos e hipnótico-sedantes prescritos en 2012 (DHD, % respecto al total). Fuente: elaboración propia a partir de datos proporcionados por la AEMPS [73].

El patrón de consumo de estos fármacos difiere del resto de drogas de abuso, mostrando una prevalencia de consumo en el último año para la población femenina que dobla a la masculina (15.3 % frente al 7.6 %). Este patrón diferenciado de consumo también puede observarse en otros fármacos como los tranquilizantes o los somníferos. Por otra parte, la franja de edad en la que se encuentra una mayor prevalencia de consumo anual difiere de la reflejada para otras drogas como pueden ser cannabis, la cocaína o las anfetaminas, siendo su prevalencia más alta en el rango de 34 a 65 años con un 14.5 % frente al 6.3 % en la franja de 15 a 34 años y más concretamente entre los 55 y 64 años (27 % para las mujeres, 11.3 % para los hombres). Así mismo, la edad en la que se inicia el consumo de estas sustancias se encuentra en los 34.5 años de media [13, 14].

1.2.2 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

1.2.2.A Aspectos generales

Los antiinflamatorios no esteroideos (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) son un grupo de fármacos heterogéneo que se emplean como antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos ya que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Para ello basan su mecanismo de acción en la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), bien de forma reversible (la mayoría de los NSAIDs) o irreversible (ácido acetilsalicílico). Estas enzimas son las encargadas de regular

la producción de ácido araquidónico y su conversión en prostaglandinas y tromboxanos, presentes en los procesos inflamatorios, febriles o dolorosos [75].

El primer NSAID sintetizado comercialmente fue el ácido acetilsalicílico, o “Aspirina”, por Bayer en 1897 cuando se logró transformar el ácido salicílico en ácido acetilsalicílico a través de una reacción de esterificación. A partir de ese momento la síntesis y llegada al mercado de nuevos NSAIDs ha estado en constante cambio y evolución especialmente en el último siglo. Hoy en día, los NSAIDs se encuentran entre los fármacos más consumidos en todo el mundo ya que pueden ser comprados con o sin receta. Se usan en procesos leves o moderados frente a otro tipo de fármacos de carácter “esteroideo” como son los corticoides u opioides, de mayor efecto analgésico aunque con efectos secundarios más importantes como son la farmacodependencia y tolerancia. Entre algunos de los efectos secundarios de los NSAIDs se encuentran la posibilidad de causar hemorragias digestivas, úlceras y disfunción renal. Su principal vía de administración es la vía oral donde se absorben rápida y completamente, aunque también existen preparados que pueden ser suministrados por vía tópica, parenteral o rectal. Se usan de forma esporádica aunque también pueden formar parte de un tratamiento crónico como en el caso de padecer artritis reumatoidea, osteoartritis, o espondilitis anquilosante entre otras [76].

1.2.2.B Clasificación

Los NSAIDs estudiados en esta Tesis forman parte del grupo ATC M01AB y M01AE como se recoge en la figura II.2. A continuación, se hace una pequeña descripción de las familias a las que pertenecen los NSAIDs estudiados así como de otras familias, que, si bien no se han incluido en este trabajo, son ampliamente conocidos o de especial relevancia en términos de consumo.

- Los salicilatos (M01BA, N02BA): Producen la inhibición irreversible de la ciclooxigenasa plaquetaria a través de una acetilación por lo que están relacionados con problemas de coagulación. Además, pueden producir trastornos gastrointestinales y nefríticos. El compuesto más representativo del grupo es el ácido acetilsalicílico o “Aspirina”.

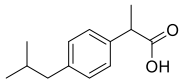
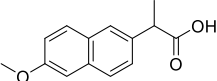
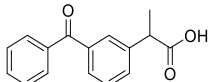
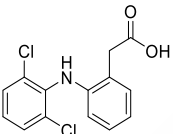
- Los profenos o derivados arilpropiónicos (M01AE): Los derivados del ácido propiónico poseen efectos analgésicos similares al ácido acetilsalicílico, aunque sus efectos antiinflamatorios y antipiréticos son inferiores. Ibuprofeno (IBU), ketoprofeno (KET) y naproxeno (NAP) son los compuestos más destacados dentro de este grupo.
- Derivados aril acéticos (M01AB): Poseen una acción analgésica y antipirética semejante a la del ácido acetilsalicílico, mientras que su acción antiinflamatoria es más potente y son susceptibles de causar problemas hematológicos más graves. El diclofenaco (DIC) es el fármaco más representativo de este grupo.
- Coxibs (M01AH): Se caracterizan por ser inhibidores selectivos de la COX-2 por lo que los sangrados y úlceras son menores que los producidos por otros NSAIDs no selectivos.

1.2.2.C Estructura y propiedades

A continuación en la tabla II.7 se recogen las estructuras de los NSAIDs seleccionados para el trabajo de esta Tesis y sus principales propiedades fisicoquímicas. Su selección se ha basado en su elevado consumo en España (ver apartado 1.2.2.E) y por ser unos de los más detectados en aguas residuales y superficiales [77, 78]. Además, su similitud estructural hace que las condiciones para su extracción de matrices acuosas sean similares.

Como se puede observar en la tabla II.7, todos los compuestos seleccionados poseen un grupo carboxílico lo que les confiere características ácidas (pK_a inferior a 5) y por tanto, se encontrarán como sustancias aniónicas en el medio acuático. En el caso de los compuestos estudiados, el log D a pH 7 oscila entre 0.2 y 1.8 con lo que son compuestos con muy poca tendencia a ser adsorbidos sobre la materia particulada presente en el medio y se encuentran mayormente en disolución acuosa. Por otra parte, su presión de vapor es muy baja con lo que tampoco se caracterizan por ser compuestos extremadamente volátiles y por lo tanto tienden a acumularse en el medio acuoso de forma significativa [7].

Tabla II.7. Estructura y principales propiedades físicoquímicas de los NSAIDs estudiados en esta Tesis. Valores estimados de pK_a , Log D, Log K_{ow} y P_{vapor} recogidos en la base de datos Scifinder [7]. MW: peso molecular, P_{vapor} : Presión de vapor.

Comp.	Estructura	Fórmula	MW	CAS	pK_a	log D (pH=7, 25 °C)	log K_{ow}	$P_{vapor}/$ torr
IBU		$C_{13}H_{18}O_2$	206.3	15687-27-1	4.4	0.9	3.5	1.4×10^{-4}
NAP		$C_{14}H_{14}O_3$	230.3	22204-53-1	4.8	0.7	2.9	3.0×10^{-7}
KET		$C_{16}H_{14}O_3$	254.3	22071-15-4	4.2	0.2	2.9	3.3×10^{-8}
DIC		$C_{14}H_{11}Cl_2N_2O_2$	296.2	15307-86-5	4.2	1.8	4.5	1.6×10^{-7}

1.2.2.D Metabolismo

Los NSAIDs aquí recogidos poseen un carbono asimétrico (a excepción de DIC) por lo que se suelen administrar en forma de mezcla racémica puesto que la separación de ambos isómeros suele ser un proceso caro y laborioso. Una vez que los NSAIDs son ingeridos, se produce en el organismo una inversión del centro quiral catalizada por enzimas isomerasas que permiten transformar la forma R (inactiva) en el correspondiente enantiómero S (farmacológicamente activo) en diferente extensión [70]. Una excepción es el NAP que se ha conseguido sintetizar industrialmente en su forma enantiomérica con un elevado rendimiento para la obtención del isómero S [79]. También para IBU y KET se comercializa el preparado farmacéutico que contiene únicamente el enantiómero S (dexibuprofeno y dexketoprofeno respectivamente) que se metaboliza más rápido y actúa de forma más efectiva que la correspondiente mezcla de isómeros.

En cuanto a su vida media plasmática se pueden dividir en NSAIDs de vida media corta (menor a 6 horas) como el DIC, IBU, y KET y NSAIDs de vida media larga (mayor a 10 horas) como el NAP. Su metabolización se produce casi totalmente en el hígado, conjugándose con el ácido glucurónico para su excreción a través de la orina aunque también se puede eliminar un pequeño porcentaje a través de las heces y el sudor. Una

vez que los derivados conjugados alcanzan el agua residual las enzimas β -glucuronidasas presentes en la materia fecal se encargan de romper los enlaces analito-glucorónido con lo que la forma libre es la única que está presente en el medio acuático. Esta transformación también ocurre para la mayoría de los fármacos excretados en formas conjugadas [78].

Se sabe que más del 60 % de una dosis de IBU es excretada en 24 horas a través de la orina, mientras que el porcentaje restante se excreta a través de la bilis en las heces. Los metabolitos excretados a través de la orina incluyen alrededor de un 9 % como derivado 2-hidroxilado (2-hidroxiIBU) en forma libre y un 17 % como metabolito conjugado. Junto con este metabolito inactivo también se forma un segundo metabolito (el 2-carboxilIBU) en una extensión del 16 % y un 19 % como 2-carboxilIBU conjugado. El porcentaje de IBU excretado sin cambios es inferior al 10 %. El NAP se metaboliza más lentamente que el IBU con un porcentaje del 50 % de una dosis excretada en las primeras 24 horas, mientras que se necesitan alrededor de 5 días para que este porcentaje alcance el 94 %. Su eliminación ocurre prácticamente a través de la orina, mientras que un porcentaje inferior al 2 % lo hace a través de las heces. Alrededor del 60 % de una dosis se excreta como NAP conjugado, un 20 % como desmetilNAP y un 5 % como 6-O-desmetilNAP, mientras que menos de un 10 % se excreta como NAP intacto. El último derivado propiónico (KET) posee un metabolismo rápido (el 75 % de una dosis se elimina en 24 horas) y se excreta como un glucorónido conjugado (90 %) y algún metabolito hidroxilado minoritario [19]. El DIC es el NSAID con el metabolismo más lento ya que el 70 % de una dosis tarda alrededor de 3 días en ser excretada. En la orina se encuentra entre un 20 y 40 % de glucorónidos y sulfatos conjugados del principal metabolito del DIC, 4'-hidroxiDIC, que todavía es activo y alrededor de un 15 % como DIC conjugado. Otros metabolitos que han sido detectados en orina son el 5-hidroxiDIC (en torno a un 12 %), el 3'-hidroxiDIC y el 4',5-dihidroxiDIC. La excreción a través de las heces es más significativa que en el caso de otros NSAIDs ya que entre un 10 y 20 % de una dosis se elimina por este medio como 4'-hidroxiDIC y menos de un 5 % como DIC intacto [19].

1.2.2.E Consumo

El mismo estudio de Simó Miñana [72] que se presentó en el apartado 1.2.1.D , también aporta datos sobre el consumo de NSAIDs (estimado a partir del número de unidades vendidas) para los países pertenecientes a la OECD. En él se puede observar que España se encuentra en la media europea (promedio del período 2000-2007) para el consumo de NSAIDs del grupo M01A con 48.8 DHD frente a las 48.1 DHD para Europa, siendo Finlandia, Islandia y Portugal los países que han notificado un mayor consumo para este grupo terapéutico en el período estudiado (76.1 DHD, 64.4 DHD y 64.4 DHD, respectivamente).

En 2014 la AEMPS publicó un informe en el que se recopilan los datos sobre el consumo de NSAIDs en España en el período 2000-2012 en base a los envases vendidos [80]. En términos generales, se ha pasado de 38.7 DHD en el año 2000 a 49 DHD en 2012, lo que supone un incremento del 26.6 %. Este incremento no se ha producido de forma homogénea a lo largo de los años, sino que se puede observar un aumento progresivo hasta 2009 (ver figura II.5) y a partir de ese año se aprecia una ligera tendencia decreciente excepto para los coxibs.

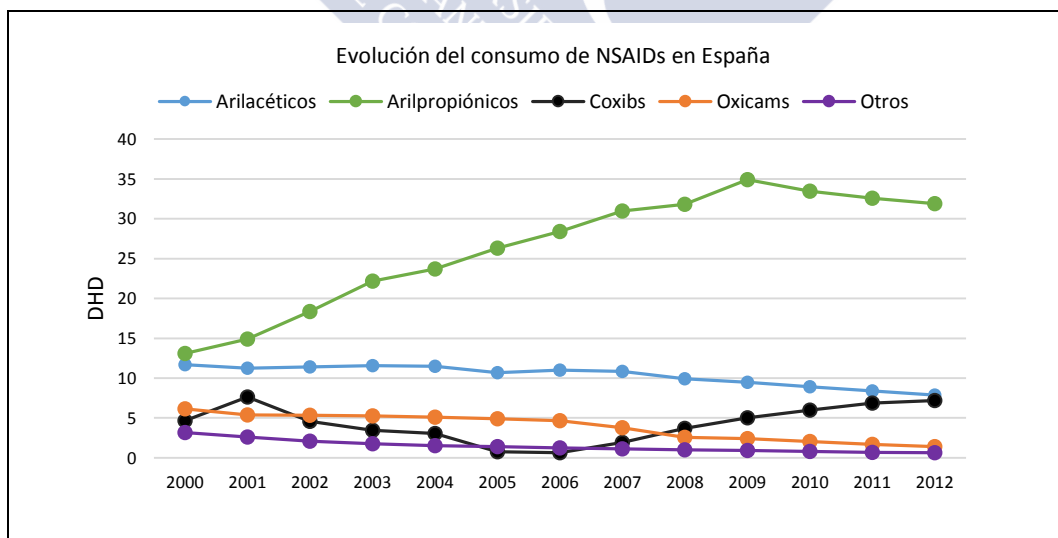


Figura II.5. Consumo de NSAIDs durante el período 2000-2012 en España. Fuente: elaboración propia a partir de los datos de la AEMPS [80].

En 2012 del total de DHDs para los NSAIDs, los derivados arilpropiónicos supusieron un porcentaje del 65 % (31.9 DHD), la siguiente familia más consumida han

sido los arilacéticos con un 16 % (7.9 DHD), seguidos por coxibs (15 %, 7.2 DHD) y el 4 % restante se corresponde a salicilatos, oxicams, pirazolonas e indolacéticos conjuntamente. Haciendo un análisis por principios activos (ver figura II.6) se puede observar que el consumo de IBU representa casi el 70 % del total de arilpropiónicos consumidos diariamente en España en 2012, lo que equivale a unas 22 DHD. Aunque su consumo disminuyó a partir de 2009, el IBU representa todavía el 43.9 % dentro del consumo diario total de NSAIDs. El NAP es el segundo arilpropiónico más consumido con 7.2 DHD (23 % del total de arilpropiónicos) y el KET (sumado KET y dexKET) con 2.6 DHD que equivalen al 8 % del total de esta familia (figura II.6A). En lo correspondiente al consumo de arilacéticos el compuesto más consumido es con diferencia el DIC con 6.4 DHD que equivalen a un 81 %, seguido por aceclofenaco y nabemetona (1.3 y 0.2 DHD, respectivamente, figura II.6B).

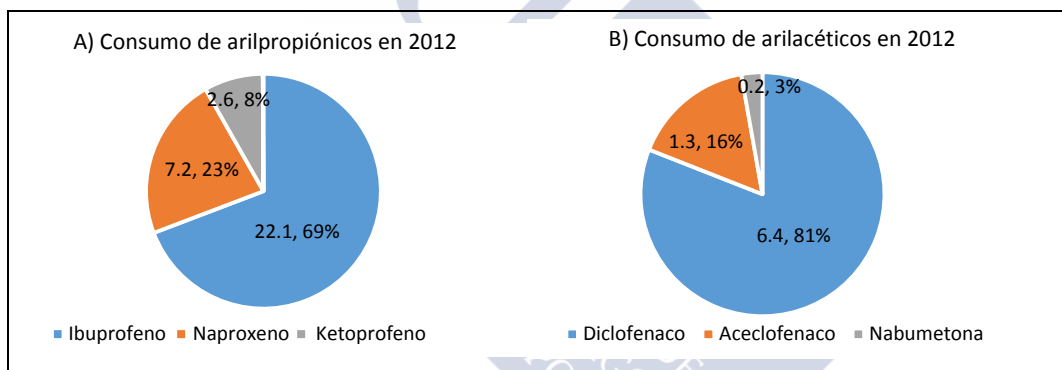


Figura II.6. Desglose por principio activo del consumo de arilpropiónicos (A) y arilacéticos (B) (DHD, % respecto al total) en 2012. Fuente: elaboración propia a partir de los datos obtenidos del la AEMPS [80].

2 INTERÉS MEDIOAMBIENTAL DE LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y FÁRMACOS

Las drogas de abuso y los fármacos se han incluido en el grupo de contaminantes emergentes del medio acuático en los últimos años. Son sustancias exógenas y su introducción en el medio depende en gran medida del consumo humano y del tratamiento que se lleva a cabo en las WWTPs. Muchas veces estos tratamientos no son eficaces para la completa eliminación de estas sustancias con lo que pueden acabar contaminando aguas superficiales, ríos y lagos como así lo han demostrado diferentes trabajos [28, 81-84]. A continuación, en los siguientes apartados de esta sección se va a realizar un resumen de las concentraciones detectadas en muestras acuosas y de algunas consecuencias que la presencia de estas sustancias en el medioambiente podría ocasionar para la vida de los organismos acuáticos, debido a que todavía poseen una importante actividad farmacológica.

2.1 DROGAS DE ABUSO EN EL MEDIOAMBIENTE

La cocaína ha sido la primera droga ilícita detectada en agua residual [25]. A partir de ese momento, se desarrollaron metodologías que permitieron detectar una gran variedad de drogas de abuso en matrices acuosas [10]. En la tabla II.8 se resumen las concentraciones detectadas en agua residual sin tratar (influyente) para cannabinoides y ATS en diferentes países de la Unión Europea, Estados Unidos (EEUU), Canadá y Australia.

El THC es un analito que se excreta en muy baja proporción y presenta un reto analítico importante [85-88] por lo que no ha sido incluido en muchos estudios [29, 82, 88-94] (y tabla II.8). Sin embargo, las publicaciones que lo han considerado no lo han detectado en concentraciones muy elevadas, mostrando valores cercanos a los 30 ng L⁻¹ en España [30, 31, 86, 95] o Grecia [96]. En cuanto a su principal metabolito, el THCCOOH está presente en concentraciones bajas a moderadas (30-300 ng L⁻¹) en toda Europa, destacando muestras puntuales en Francia [97], Países Bajos [98], Grecia [96] y España [31, 99, 100] con valores superiores (400-1200 ng L⁻¹).

Tabla II.8. Rango de concentraciones (mínimo-máximo, ng L⁻¹) de drogas de abuso detectadas en influente. nc: engloba aquellos compuestos que no se han podido cuantificar, bien porque no se han detectado o porque se encuentran por debajo del límite de cuantificación (LOQ) o de determinación (LOD). ^a Representa el valor medio.

País	THC	THCCOOH	AMP	MAMP	MDA	MDMA	MDEA	Ref
España	nc-31	nc-96	--	--	--	--	--	[30]
	13-127	24-402	--	--	--	--	--	[31]
	nc-23	36-401	nc	nc	nc	nc	nc	[99]
	nc	nc-228	nc-84	15-33	nc	nc-26	nc	[86]
	--	--	3-688	3-277	3-266	2-598	6-114	[101]
	--	--	15 ^a -15	nc	nc	49 ^a -91	27 ^a	[102]
	--	19-940	2-110	1-69	--	nc-159	--	[100]
	nc-34	4-32	6-41	3-18	--	47-245	--	[95]
Grecia	3-32	12-584	nc-10	nc	nc	nc-2	nc-1	[96]
Croacia	--	21-128	nc-31	--	--	nc-33	--	[89]
Bélgica	--	--	15-121	1-10	--	2-197	--	[90]
Italia	--	63-91	nc-15	nc-16	nc-5	14	nc-1	[29]
Suiza	--	nc	nc-93	nc-27	--	nc-108	--	[88]
Francia	--	76-1196	nc-82	nc-51	nc-1637	nc-136	nc	[97]
Países Bajos	nc	nc-489	40-1779	nc-17	nc	16-241	nc	[98]
Reino Unido	--	--	830 ^a -2300	2 ^a -4	10 ^a -15	39 ^a -138	nc	[82]
EEUU	--	--	45 ^a	225 ^a	--	22 ^a	nc	[92]
	--	--	80-550	nc-2000	nc-6	nc-70	nc	[93]
Canadá	--	--	nc-25	nc-65	nc	9-35	--	[94]
	--	--	23 ^a -60	nc ^a -60	nc	69 ^a -138	--	[103]
Australia	--	--	--	12-4108	--	5-706	--	[91]

Como se observa en la tabla II.8 AMP, MAMP y MDMA son los ATS que tradicionalmente se han incluido en los métodos de análisis de agua residual, mientras que el número de artículos que incluyen en su metodología MDA o MDEA es menor. En España, el consumo de ATS no es muy elevado comparado con el de otras drogas. Así las concentraciones detectadas en influente han sido bajas, no siendo detectados en algunos casos [86, 99, 102] o haciéndolo en concentraciones en torno a los 100 ng L⁻¹ [86, 95, 100, 102]. Sin embargo, en estudios realizados en Cataluña durante el año 2008 por Fontela et al. [101] los ATS superan ampliamente las concentraciones medias observados en el resto de España, con valores alrededor de los 600 ng L⁻¹ para AMP y MDMA, 300 ng L⁻¹ para

MAMP y MDA y 100 ng L^{-1} para MDEA. También en la misma región Postigo et al. [95] publicaron valores elevados (máximo de 245 ng L^{-1}) para MDMA aunque bajos para el resto de ATS no superando los 50 ng L^{-1} . Al igual que en España, la tónica general es que los ATS no se encuentren en concentraciones superiores a 100 ng L^{-1} si bien algunos países superan de forma puntual esos valores, como por ejemplo los Países Bajos [98], Reino Unido [82] (1779 ng L^{-1} y 2300 ng L^{-1} respectivamente para AMP), Australia [91], EEUU [93] (4108 ng L^{-1} y 2000 ng L^{-1} respectivamente para MAMP) o Francia [97] (máximo de 1637 ng L^{-1} para MDA).

Diferentes estudios recogen las concentraciones de estos compuestos en el agua tratada de la depuradora (efluente), y en ellos se muestra que todavía siguen estando presentes [29, 82, 86, 95, 99, 102] siendo el THCCOOH uno de los más persistentes, con concentraciones que pueden llegar a 77 ng L^{-1} [99], también los ATS se detectan en agua ya tratada pero a concentraciones relativamente más bajas (alrededor de los $10\text{-}30 \text{ ng L}^{-1}$ generalmente) [29, 82, 86, 95, 99, 102].

El destino final de las aguas residuales es su vertido en un río en las mejores condiciones de limpieza e higiene posible tratando de alterar mínimamente su ecosistema. A pesar de ello, las drogas de abuso han sido detectadas en varios ríos [82, 99, 102]. Uno de los estudios más amplios ha sido el desarrollado por Zuccato et al. [104] en el que estudiaron cuatro ríos y tres lagos italianos y un río inglés con un total de 18 puntos de muestreo. En sus conclusiones se puede observar una mayor contaminación en los ríos que en los lagos con concentraciones detectables para THCCOOH, AMP, MAMP, MDA y MDMA aunque nunca superiores a los 5 ng L^{-1} . También en España se han hecho estudios en ríos, uno de los más destacables es el publicado por Huerta Fontela et al. [105] en el que evaluaron la presencia de drogas de abuso y otros fármacos en un río que abastece una planta potabilizadora. El estudio se realizó en diferentes estaciones entre 2006 y 2007 y se observó un incremento apreciable en las concentraciones de AMP, MAMP, MDA y MDMA en los meses estivales respecto a los meses de invierno y primavera, alcanzando niveles de 50 ng L^{-1} , 0.4 ng L^{-1} , 20 ng L^{-1} y 40 ng L^{-1} , respectivamente. Afortunadamente estos compuestos fueron eliminados totalmente tras los procesos de limpieza y desinfección y no pudieron ser detectados en el agua procesada.

Por su naturaleza altamente polar las drogas de abuso no tienden a encontrarse en altas concentraciones en sólidos y materia particulada, por lo que los estudios en este campo son escasos. No obstante, las anfetaminas han podido ser detectadas a niveles muy bajos (ng g^{-1}) en lodos [106, 107] y material particulado suspendido en agua [94, 108].

2.2 BENZODIACEPINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN EL MEDIOAMBIENTE

Las BZPs se consumen en grandes cantidades aunque el estudio de su presencia en el medioambiente es todavía reciente y la mayoría de las publicaciones recogen datos de 2 a 7 analitos (principalmente OXA, TEM, ALP y DIA). La mayoría de los estudios se centran en aguas de origen residual bien sea tratada o sin tratar aunque también existen algunos trabajos que detectan BZPs en agua superficial de ríos y lagos [82-84, 109] con lo que se demuestra una vez más la contaminación de aguas potencialmente usadas para la producción de agua potable con contaminantes emergentes. En la tabla II.9 se recogen algunos de los resultados más relevantes en cuanto a las concentraciones de BZPs detectadas en agua residual y superficial tanto en Europa como en España.

El DIA es uno de los compuestos en que más atención se ha puesto, aunque se ha detectado en pocas ocasiones debido en gran parte a su alto porcentaje de metabolización (ver tabla II.6). Sin embargo sus metabolitos (OXA, TEM y NDIA) son detectados en concentraciones más altas debido a su mayor porcentaje de excreción. Se debe de tener en cuenta que el OXA y NDIA no son metabolitos exclusivo del DIA ya que también están presentes en el metabolismo de otras BZPs y que tanto OXA, NDIA y TEM pueden ser administrados como principio activo en mayor o menor medida dependiendo del país.

En Alemania y los Países Bajos es dónde se han encontrado las concentraciones más elevadas de OXA en influente (próximas a $1 \mu\text{g L}^{-1}$) [84, 98, 110] mientras que en en resto de países la concentración es menor (entre $60\text{-}300 \text{ ng L}^{-1}$) [82, 96, 111]. Además, el OXA mostró una eliminación muy baja en las depuradoras ya que las concentraciones detectadas en efluente permanecieron prácticamente invariables [82, 84, 96, 98, 110].

Tabla II.9. Rango de concentraciones (mínimo-máximo, ng L⁻¹) detectados en influente, efluente y agua superficial (río o lago) para las BZPs y compuestos relacionados estudiados en esta Tesis. nc: no detectado o no cuantificable por ser inferior al límite de detección (LOD) o de cuantificación (LOQ). ^a Media, ^b mediana.

COMPUESTO/PAÍS	INFLUENTE	EFLUENTE	SUPERFICIAL	REF
Diazepam				
Reino Unido	nc	5 ^a -6	0.8 ^a -1	[82]
Alemania	nc	nc	--	[110]
	nc	nc	nc-2	[84]
Grecia	nc-1	nc-2	--	[96]
Serbia	--	nc	nc	[112]
España	nc	--	4-41	[83]
	--	nc	--	[113]
	3 ^a -12	--	nc	[109]
	nc	nc	-	[114]
Oxazepam				
Países Bajos	109-915	237-994	--	[98]
Reino Unido	50 ^a -114	58 ^a -83	11 ^a -17	[82]
Alemania	140 ^b -190	130 ^b -180	--	[110]
	480 ^b -860	320 ^b -630	90 ^b -400	[84]
Suecia	140-280	--	--	[111]
Grecia	19-63	6-74	--	[96]
España	20 ^a -46	--	nc	[109]
	21-1218	27-324	--	[114]
	83 ^a	84 ^a	nc	[115]
Temazepam				
Países Bajos	92-414	133-508	--	[98]
Reino Unido	167 ^a	135 ^a	28 ^a	[82]
Grecia	3-152	3-23	--	[96]
Alemania	55 ^b -230	50 ^b -180	23 ^b -58	[84]
Nordiazepam				
Países Bajos	nc-21	4-11	--	[98]
Reino Unido	25 ^a -52	10 ^a -14	3 ^a -6	[82]
Alemania	nc	nc	--	[110]
	nc	nc	nc	[84]
Grecia	0.6-4	3-5	--	[96]
España	16 ^a	17 ^a	nc	[115]
Clordiazepóxido				
Reino Unido	nc	nc	nc	[82]
Grecia	nc	nc	--	[96]
España	54 ^a -265	--	nc	[109]
	274-5937	127-29395	--	[114]

Tabla II.9. (continuación)

COMPUESTO/PAÍS	INFLUENTE	EFLUENTE	SUPERFICIAL	REF
Alprazolam				
Grecia	7-42	3-10	--	[96]
Suecia	nc	--	--	[111]
España	--	--	nc	[83]
	nc	--	--	[109]
	nc-4	nc-1	--	[114]
	27 ^a	17 ^a	11 ^a	[115]
Bromazepam				
Grecia	52-316	34-166	--	[96]
Alemania	nc	nc	nc	[84]
Serbia	--	nc	nc	[112]
España	7 ^a -14	--	nc	[109]
	nc-3662	nc-15542	--	[114]
Lorazepam				
Grecia	13-30	8-27	--	[96]
Serbia	--	nc	nc	[112]
España	nc	--	10-40	[83]
	nc	nc	nc	[109]
	nc-502	nc-532	--	[114]
	10598 ^a	689 ^a	562 ^a	[115]

Debido a ello, su presencia en ríos y lagos ha podido ser confirmada, llegando a 400 ng L⁻¹ en Alemania [84] aunque la mayoría de trabajos que analizan OXA en aguas residuales, no dan datos acerca de su presencia en aguas superficiales (tabla II.9). En España, la presencia de OXA en influente es mucho menor que en otros países de la Unión Europea y las concentraciones máximas no superan los 100 ng L⁻¹, excepto en el trabajo publicado por Huerta-Fontela et al. [114] donde el valor máximo de OXA superó 1 µg mL⁻¹. El TEM es otro de los analitos que se encuentra en concentraciones relativamente elevadas en Europa (máximos entre 150-400 ng L⁻¹) e igual que ocurre con OXA, los tratamientos realizados en las depuradoras no parecen ser los más idóneos para eliminar TEM de la corriente de agua, llegando a detectarse concentraciones máximas entre 23-500 ng L⁻¹ en efluente, mientras que su presencia en aguas superficiales alcanza un valor promedio de 25 ng L⁻¹ [82, 84]. La presencia de TEM en aguas superficiales y/o residuales no ha sido analizada hasta el momento en España. En último lugar el NDIA se

ha detectado en menor concentración tanto en Europa como en España, no superando los 25 ng L⁻¹ de media [82, 96, 98, 110, 115] .

ALP, FLUN y su metabolito (7AFLUN), MID, y ZOLP son compuestos poco estudiados sobre los que hay un número muy reducido de publicaciones y aportan pocos datos sobre su presencia en muestras acuosas, muchas veces no superando los límites de cuantificación (*limit of quantification*, LOQ) o detección (*limit of detection*, LOD) de los métodos propuestos [96, 109, 111, 114]. El BROM es otro de los analitos que no ha sido incluido de forma mayoritaria en los métodos que determinan BZPs por lo que casi no existen datos para este compuesto, sólo Borova et al. [96] publicaron concentraciones moderadamente elevadas en su estudio en Grecia, tanto en influente (promedio de 100 ng L⁻¹) como en efluente (promedio de 40 ng L⁻¹) y Huerta-Fontela et al. [114] valores cien veces superiores en España (máximo de 3.6 µg L⁻¹ en influente y un máximo de 15.5 µg L⁻¹ en efluente).

El CHLOR y el LOR han sido otros compuestos detectados en muy bajas concentraciones en Europa (~30 ng L⁻¹) [82, 96]. Sin embargo, la tendencia en España para estos dos compuestos es diferente ya que en dos estudios realizados por Huerta-Fontela et al. [109, 114] publicaron valores máximos de 0.26 y 29 µg L⁻¹ en aguas residuales para CHLOR y Esteban et al. [115] publicaron valores que superan los 10 µg L⁻¹ para LOR en influente y superiores a 0.5 µg L⁻¹ en efluente y aguas superficiales.

Finalmente el RIT, (principal metabolito del MPHEN) ha sido monitorizado en EEUU en diferentes campañas coincidiendo con los semestres escolares y se observó una elevada concentración en influente (300-700 ng L⁻¹), con un considerable aumento en época de exámenes (hasta 1.5 µg L⁻¹) mientras que el compuesto sin metabolizar (MPHEN) no ha sido incluido en ese estudio [65]. También en Europa, en un estudio llevado a cabo en Alemania se detectó la presencia de RIT en concentraciones medias de 118 ng L⁻¹ en agua residual y mostrando una alta persistencia a la degradación [116]. La presencia de MPHEN en Europa ha sido poco estudiada, sólo presente en estudios realizados en Alemania, Países Bajos, y Suecia en concentraciones próximas a los LOQs [98, 111, 116].

A la vista de los resultados recogidos en la tabla II.9 parece necesario realizar un estudio más profundo sobre la presencias de BZPs en matrices acuosas debido a los pocos

datos de los que se disponen para algunos compuestos especialmente susceptibles de un consumo ilícito (MPHEN, ZOLP y FLUN entre otros). Por otra parte la presencia de BZPs en material particulado y lodos no ha sido muy relevante, ya que los únicos trabajos que analizan estos compuestos obtienen concentraciones muy bajas, o directamente no detectables, no superando en ningún caso los 20 ng g^{-1} [108, 117, 118].

2.3 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN EL MEDIOAMBIENTE

Los NSAIDs se detectan en mayor concentración en muestras acuosas que adsorbidos sobre muestras sólidas debido a sus valores de pK_a y $\log D$ (tabla II.7) [117, 119, 120]. Existen numerosos artículos que evalúan la presencia de NSAIDs en el medio ambiente, uno de los más exhaustivos ha sido el realizado por Verlicchi et al. [121] en 2012. Dicha revisión incluye 78 artículos con un total de 118 fármacos recogiendo su concentración en muestras de influente y efluente en todo el mundo como así lo ejemplifica la figura II.7, en cuanto a los NSAIDs estudiados en esta Tesis. Como se puede observar, IBU, NAP, KET y DIC están presentes en influente en concentraciones medias de 37, 6, 1.1 y $1 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Como era de esperar, su concentración en el medioambiente concuerda con su alto consumo (ver sección 1.2.2.E). Comparando los datos de varios estudios realizados en España [122-124] con los proporcionados en esta revisión se observa que las concentraciones detectadas para IBU son un poco menores encontrándose entre los 0.54 y los $20 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que los valores para NAP se sitúan en torno a la media proporcionada por Verlicchi et al. con un rango entre 0.7-6.4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente los otros dos analitos, KET y DIC se han detectado en concentraciones no superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, al igual que en la mayor parte de los artículos revisados por Verlicchi et al [121].

La presencia de NSAIDs en muestras de efluente también ha sido revisada en el mismo artículo y se recoge de forma gráfica en la figura II.7B. Como resultado de los tratamientos en las WWTPs las concentraciones promedio reflejan una concentración en efluente de 3.6, 1.0, 0.36 y $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ para IBU, NAP, KET y DIC respectivamente, mostrando una disminución de entre 6 y 10 veces respecto a las concentraciones detectadas en influente.

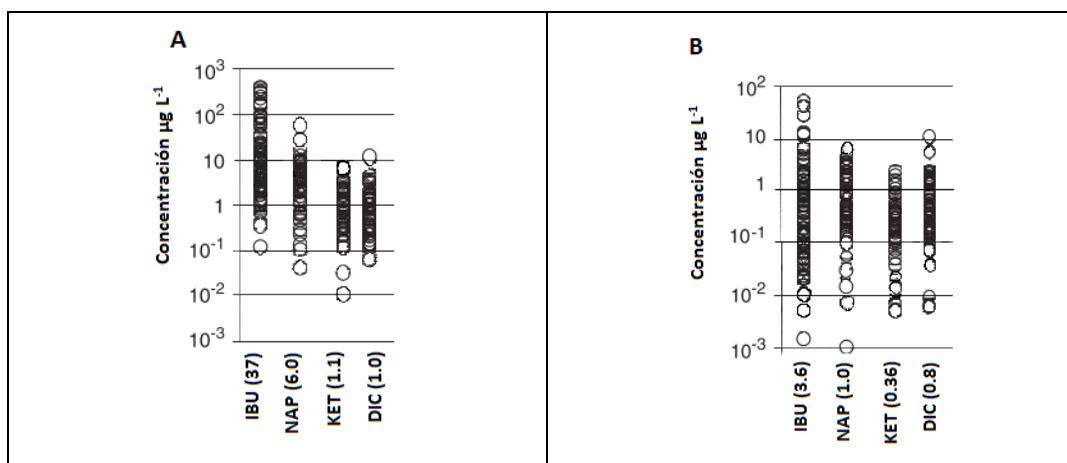


Figura II.7. Concentración de los NSAIDs estudiados en esta Tesis en influente (A) y en efluente (B). Entre paréntesis se recoge la concentración promedio. Adaptado de Verlicchi et al. [121] con permiso de Elsevier.

Especial atención requiere el DIC ya que este analito permanece en concentraciones prácticamente invariables, constantando su resistencia a los tratamientos llevados a cabo en la planta de tratamiento. Los datos publicados para España en este tipo de matrices se encuentran muy próximos a estos valores con un rango para IBU entre $0.9\text{--}5.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [122-124], pudiendo llegar a $150 \mu\text{g L}^{-1}$ cuando lo que se muestrea es un efluente hospitalario [125]. Para NAP, KET y DIC los valores medios se sitúan en $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$, $0.33 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente [122-125]. Como se ha podido observar, los tratamientos tradicionales no sirven para eliminar la totalidad de los NSAIDs del agua pero eliminan un porcentaje importante de alguno de ellos. No obstante, al encontrarse inicialmente en concentraciones tan elevadas, estos tratamientos no son suficientes puesto que todavía se pueden observar concentraciones próximas al $\mu\text{g L}^{-1}$ en efluente para alguno de los analitos.

Una vez que el agua sale de la planta de tratamiento se vierte a los cauces de ríos y/o mares y es posible detectar estos analitos en muestras de agua superficial como así se recoge en la tabla II.10. Como se puede observar las concentraciones son mucho menores, debido a la mayor dilución de la muestra. Aún así, se han detectado concentraciones superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para alguno de los NSAIDs estudiados [126]. De nuevo es el IBU el que se ha detectado en un mayor número de ocasiones, con concentraciones que oscilan entre 0.01 y $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$. La presencia de NAP también es

destacable sobrepasando los $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ en múltiples ocasiones [126-130]. También el DIC se encuentra en concentraciones relativamente elevadas para tratarse de un agua superficial con valores entre 0.09 y $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ confirmando una vez más su persistencia. Finalmente, el KET es el compuesto con menor presencia en las aguas superficiales no pudiendo ser cuantificado en la mayoría de los casos o haciéndolo en concentraciones del orden de $\sim 10 \text{ ng L}^{-1}$.

Tabla II.10. Rango de concentraciones de los NSAIDs considerados en esta Tesis (mínimo-máximo, en $\mu\text{g L}^{-1}$) en diferentes aguas superficiales (ríos o lagos). nc: no detectado, <LOD o <LOQ.

País	IBU	NAP	KET	DIC	Ref
España	nc-0.15	nc-0.05	nc	nc-0.06	[131]
	nc	nc	0.02	nc	[124]
Italia	nc-0.2	nc-0.02	nc-0.007	nc-0.05	[132]
Eslovenia	nc	nc-0.3	nc	nc-0.3	[127]
Suiza	nc-0.080	nc-0.4	nc-0.005	nc-0.15	[128]
Suecia	0.06	0.18	--	0.7	[129]
Francia	nc-0.004	nc-0.01	nc-0.015	0.001-0.03	[133]
Reino Unido	nc-0.1	nc-0.1	nc-0.01	nc-0.26	[130]
	nc	--	--	nc-0.09	[134]
Singapur	nc-0.01	nc-0.008	nc	nc-0.002	[135]
Irán	0.02	0.009	nc	--	[136]
México	0.8-2.2	0.8-0.9	nc	nc	[126]

2.4 ECOTOXICIDAD

Los compuestos exógenos producidos por el hombre vertidos al ecosistema acuático provocan cambios en el mismo que podrían afectar negativamente a la vida y al desarrollo de las especies presentes en él como ya se ha ido demostrado a lo largo de los años con estudios ecotoxicológicos para numerosos contaminantes emergentes [137, 138]. A continuación se describen brevemente algunos de los efectos más reseñables para los compuestos estudiados en esta Tesis.

2.4.1 CANNABINOIDES Y ESTIMULANTES DE TIPO ANFETAMÍNICO

En cuanto a la ecotoxicidad de las drogas de abuso, existen numerosos artículos que demuestran su presencia ríos o lagos como así se ha expuesto en esta Tesis, sin embargo su biodisponibilidad y su efecto en el ciclo natural no han sido estudiados en profundidad. Se sabe que los ATS son disruptores en la captación y producción de

catecolaminas y dopamina en humanos y se sospecha que podrían tener el mismo efecto sobre algas y otros los organismos [139]. Además, debido a que poseen un grupo amino en su estructura éste podría interactuar con los ácidos nucleicos, inhibiendo la fotosíntesis o modificando la fijación de nitrógeno, influyendo por lo tanto, en el crecimiento de plantas y microorganismos [140]. A continuación, se recogen algunos de los estudios más relevantes sobre este tema, que se encuentran recogidos en una revisión realizada por Rosi-Marshall et al. [141].

En 1973, se observó que la exposición de bacterias a ATS y THC en concentraciones elevadas ($10\text{-}1000\text{ mg L}^{-1}$) alteraba su respuesta con el medioambiente modificando la interacción entre organismos [142]. En otro estudio también se observaron diferencias en la flora bacteriana presente en la mucosa oral en personas que mascaban plantas que contenían derivados anfetamínicos y las que no [143]. Por otra parte estudios sobre invertebrados, estimaron que la concentración letal media (LC_{50}) para *Daphnia magna* después de estar expuesta a sulfato de AMP durante 24 horas era de $60\text{-}265\text{ mg L}^{-1}$ [144] y un reciente estudio realizado en 2014 sobre mejillones cebra (*Dreissena polymorpha*) mostró un importante desequilibrio en su balance oxidativo cuando eran expuestos durante 14 días a $0.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de THC llegando a incrementar la carbonilación de proteínas, alteraciones lipídicas y finalmente daños en el ADN, sin embargo, concentraciones menores ($0.05\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) no produjeron efectos apreciables [145]. También los caracoles (*Lymnaea stagnalis*) vieron modificada su memoria a largo plazo debido a los efectos de la MAMP [146]. Para organismos vertebradas existen menos estudios y la mayoría se centra en especies acuáticas. En particular, en un estudio se observó que los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) sufrían reducción de la movilidad y anomalías en la espina dorsal cuando eran expuestos a THC durante 24 horas, causándoles la muerte cuando el valor era superior a 2 mg L^{-1} [147].

Hasta el momento no existe ningún estudio sobre el efecto del THCCOOH, presente en mayores concentraciones en agua que el THC, aunque Andrés-Costa et al. [100] recogen las predicciones de concentración media de efecto observado (EC_{50}) y LC_{50} para diferentes niveles tróficos (algas, dáfidos y peces) empleando el programa ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationships*) de la Agencia Estadounidense de Protección del Medioambiente (*Environmental Protection Agency of the United States, EPA*). Los

resultados mostraron que el THCCOOH sería entre 7 y 326 veces más tóxico que los ATS con valores de EC_{50} para algas de $34 \mu\text{g L}^{-1}$ y LC_{50} para dáfnidos y peces de $29 \mu\text{g L}^{-1}$ y $115 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Por otra parte González-Mariño et al. [148] realizaron estudios teórico-predictivos sobre su toxicidad empleando el programa TEST (*Toxicity Estimation Software Tool*) de la misma entidad y observaron que los productos derivados de la cloración del THCCOOH podrían llegar a ser incluso más dañinos que el propio compuesto.

2.4.2 BENZODIACEPINAS

En contraposición a lo que ocurre con otros compuestos con similar mecanismo de acción, existen pocos artículos que se centren en la ecotoxicidad de las BZPs y los estudios incluyen muy pocos analitos (OXA y DIA principalmente). Aunque a través de diferentes test de toxicidad se estableció que la concentración necesaria para observar efectos adversos crónicos sobre diferentes organismos acuáticos era elevada (en torno a los mg L^{-1} y por tanto superior a la que podía encontrarse en aguas superficiales) existen estudios que revelan sus efectos perjudiciales en diferentes especies a concentraciones más bajas.

Así, en 2013 se publicó un estudio en el que la presencia de OXA ($1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ en el agua) provocaba que la perca europea (*Perca fluviatilis*) incrementase su actividad y su grado de alimentación así como una disminución en su nivel de socialización, además de observar una elevada bioacumulación en sus tejidos [149]. También se estudió el efecto de la exposición a DIA (entre 0 y $13 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 21 días) sobre el comportamiento reproductivo y la fecundidad de la carpita cabeza (*Pimephales promelas*) y, aunque se observó un mayor número de puestas y huevos por día, cuando estos datos fueron ponderados en el tiempo no se observaron diferencias estadísticamente significativas frente a la población control [150]. También los peces de la especie *Gambusia holbrooki* mostraron cambios en la pigmentación y comportamientos anormales como letargia y movimientos anómalos [151]. Sin embargo, es el pez cebra el vertebrado acuático sobre el que más estudios se han realizado. Así, concentraciones de 0.16 mg L^{-1} de DIA redujeron la respuesta a la inmersión profunda [152] y la formación de bancos de peces [153] y concentraciones menores (0.05 mg L^{-1}) produjeron cambios en las preferencias por los extremos de los tanques [154] y su comportamiento ante la luz [155]. También sus

embriones se vieron afectados y la exposición a 235 ng L^{-1} de DIA durante 14 días alteró su comportamiento natatorio y la expresión de algunos genes [156]. No obstante, el efecto del DIA no sólo era observable en peces, sino que también era tangible en invertebrados. En esta línea, Calisto et al. [157] observaron que especies de hidras sedentarias (*Hydra vulgaris*) sufrían efectos agudos y en los crustáceos (*Artemia parthenogenetica*) se observó una inhibición de las colinesterasas solubles demostrando que el DIA (7 mg L^{-1}) podría interferir en la neurotransmisión para estas especies [158].

Se puede concluir que la ecotoxicidad de estos compuestos debería ser estudiada más en profundidad ya que los estudios publicados hasta el momento se centran en un número aislado de compuestos (especialmente en el caso de BZPs), además el efecto de un fármaco o droga puede verse incrementado por efecto sinérgico debido a la presencia de otros compuestos en el medio como así lo han demostrado diferentes autores para mezclas de varios fármacos [137, 159-161].

2.4.3 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

El DIC es el NSAID que posee la mayor toxicidad aguda ya que tanto la EC_{50} como LC_{50} son inferiores a 100 mg L^{-1} para diferentes algas y organismos invertebrados, por lo que la Unión Europea lo ha clasificado como moderadamente tóxico para el medioambiente. Además, la concentración a la que se observa toxicidad crónica para este analito es mucho más baja que para otro tipo de fármacos presentes en el medio acuático ya que la concentración más baja a la que se observa un efecto (*lowest observed effect concentration, LOEC*) se encuentra entre $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ y 50 mg L^{-1} para diferentes organismos [137]. Estos valores se encuentran con relativa frecuencia en las aguas residuales como se pudo observar en el apartado 2.3 pudiendo suponer un riesgo para las especies que habitan esos ecosistemas. Por ello, ha sido el único NSAID incluido en la primera “Watch List” de contaminantes emergentes de la Directiva Marco de Aguas Europea y, si los datos obtenidos lo avalan, podría ser incluido posteriormente en la lista de contaminantes emergentes prioritarios [162].

Estudios más concretos mostraron que el DIC ocasionaba lesiones renales en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando la concentración era superior a $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ y

alteraciones en las branquias [163] y daños a nivel subcelular a concentraciones superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ [164]. También se observó una ligera modificación en la membrana de los lisosomas de los mejillones (*Dreissena polymorpha*) expuestos durante 96 horas a 600 ng L^{-1} de DIC aunque no se constató ningún efecto citogenotóxico [165]. No obstante, otros estudios in vitro han publicado citotoxicidad para DIC en células hepáticas de diferentes peces [166]. A nivel reproductivo parece que el DIC no ocasiona daños en embriones de pez cebra y sólo se observó un ligero retraso en la rotura del cascarón cuando la concentración se encontró entre 1 y 2 mg L^{-1} [167]. Para la misma especie de mejillones (*Dreissena polymorpha*) el IBU mostró efectos citogenotóxicos de bajos a moderados y también se observaron efectos estrogénicos para IBU en adultos de pez cebra, modulando la producción hormonal en ambos sexos y modificando la función reproductiva a concentraciones de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ [168], aunque este estudio se contradice con el publicado al mismo tiempo por Morthorst et al. [169] dónde solamente observaron una disminución en la síntesis de prostanglandina PGE_2 a concentraciones entre 20 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$, sin verse afectada la capacidad reproductiva ni las funciones hormonales.

Existen muy pocos estudios en animales vertebrados terrestres, sin embargo el DIC parece estar detrás de la gota visceral (enfermedad nefrítica que ocasiona acumulaciones de ácido úrico en los órganos internos y puede conducir a la muerte de aves, como así parece haber ocurrido en buitres del continente asiático [170]).

El efecto sinérgico de varios NSAIDs presentes en agua residual podría tener efectos más acusados que los observados para cada compuesto de forma individual. Así lo confirmaron Cleuvers et al. [160] cuando observaron efectos más perniciosos sobre *Daphnia Magna* y alga verde (*Desmodesmus subspicatus*) al emplear una mezcla de NSAIDs a concentraciones inferiores a las que se observaban efectos para los NSAIDs de forma individual. También Parolini et. al [161] demostraron que la mezcla entre 1.5 y $13 \mu\text{g L}^{-1}$ inducía notables efectos citogenotóxicos afectando a los lisosomas y mostrando a la vez estrés oxidativo y Pomati et al. [159] observaron una disminución en el crecimiento de células embrionarias para especies en contacto con una mezcla que contenía 13 fármacos (incluido el IBU) a concentraciones medioambientales (ng L^{-1}). También comunidades de micro y meso organismos fueron expuestas durante 35 días a una mezcla

de 8 fármacos (entre ellos IBU) y su crecimiento, reproducción y diversidad se vió claramente disminuída a concentraciones superiores a $60 \mu\text{g L}^{-1}$.

Por otra parte los productos de transformación formados tras la desinfección de las aguas en las plantas de tratamiento pueden suponer un riesgo mayor que el propio compuesto como así lo ha demostrado Diniz et al. [171] para los (foto)productos procedentes de la degradación ultravioleta del DIC.





3 TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN

3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases (*gas chromatography, GC*) es una técnica de separación que se basa en la distinta volatilidad de los analitos presentes en una mezcla. En sus inicios estuvo limitada a compuestos poco polares y muy volátiles, pero en la actualidad la posibilidad de modificar las propiedades de los analitos mediante diferentes reacciones de derivatización ha permitido analizar multitud de compuestos. A lo largo de los años se han diseñado detectores cada vez más sensibles y selectivos, y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*gas chromatography coupled to mass spectrometry, GC-MS*) se ha consolidado como una de las técnicas más usadas en la determinación y cuantificación de analitos en muestras medioambientales debido a su elevada sensibilidad y su alto poder de discriminación [172, 173].

En la actualidad los GC están equipados en su gran mayoría con columnas cromatográficas capilares que requieren flujos de gas portador muy bajos ($1\text{--}2\text{ mL min}^{-1}$) lo cual permite una conexión directa con el espectrómetro de masas (*mass spectrometer, MS*) sin que se vea afectado el vacío del sistema, por lo que el sistema de entrada de muestra es simple y directo. Una vez que los analitos se han separado, llegan a la fuente de ionización que se está formada por un filamento encargado de generar una corriente de emisión y que permite que los analitos se fragmenten. Lo más habitual es trabajar empleando filamentos de wolframio que emiten una energía de 70 eV y es lo que se conoce como modo de impacto electrónico (*electron impact, EI*) y que produce una fragmentación particular de los analitos. Una vez que los analitos han sido fragmentados se necesita un analizador de masas y un detector (generalmente un multiplicador de iones) que permita conocer qué fragmentos se han formado y que amplifiquen la señal hasta un valor medible. Los espectros obtenidos se puede comparar con los que se recogen en las librerías comerciales (p.ej. la que elabora el *National Institute of Standards and Technology, NIST*) para la identificación y/o confirmación de los compuestos [173].

Dentro de los distintos analizadores de masas que existen, éstos se pueden clasificar en analizadores de baja resolución, donde cabe destacar el cuadrupolo o

analizador cuadrupolar (*Q*) y la trampa de iones (*ion trap*, *IT*), o ya recientemente, el acoplamiento a sistemas de alta resolución tipo tiempo de vuelo (*time of flight*, *TOF*) u Orbitrap entre otros. A continuación, se procede a describir el funcionamiento y las partes de un cuadrupolo por ser unos de los detectores más habituales en la bibliografía y además ha sido el empleado en esta Tesis para el análisis de drogas de abuso y NSAIDs.

El cuadrupolo consta de cuatro cilindros paralelos que actúan como electrodos sobre los que se aplica una combinación de potenciales de corriente continua y de radiofrecuencias desfasados 180° a cada par de cilindros de forma que sólo los iones de una cierta relación *m/z* sean capaces de atravesarlos. El sistema de alto vacío consigue valores entre 10⁻⁵ y 10⁻⁸ torr con lo que se evita la colisión entre los distintos iones generados que se encuentran en el cuadrudropolo. Con este tipo de detectores es posible trabajar en dos configuraciones diferentes:

- En **modo SIM** (*selected ion monitoring*) se transmite una relación *m/z* de forma que los potenciales de radiofrecuencias y corriente continua se mantienen constantes. De esta forma sólo los iones de esa relación *m/z* pueden atravesar el analizador mientras que los restantes iones chocan contra los cilindros convirtiéndose en moléculas neutras. Este modo se suele usar generalmente cuando se quiere utilizar el equipo de forma cuantitativa ya que al monitorizar sólo los iones más abundantes para cada compuesto el equipo es más sensible y selectivo debido a que el ruido de fondo es muy bajo.
- En **modo SCAN** se hace un barrido sobre un cierto rango de masas y se van variando linealmente los potenciales. De esta forma se obtiene como resultado una filtración continua de los iones con relación *m/z* creciente dando lugar al espectro de masas completo. El modo SCAN se usa cuando se realizan análisis cualitativos ya que no se pierde la información de ningún fragmento de masas siendo menos sensible que el modo SIM por lo que no se suele usar para cuantificar.

3.1.1 DERIVATIZACIÓN

Uno de los principales inconvenientes del análisis de compuestos polares por GC es la necesidad de un paso adicional en la etapa de preparación de muestra para la derivatización de los analitos. Aunque existen métodos en los que los compuestos polares

no son derivatizados, estos suelen tener altos LOQs que no permiten su detección a niveles traza. La reacción típica de derivatización consiste en la sustitución de un hidrógeno activo en la molécula (-OH, -COOH, -NH y -SH principalmente) por otro grupo (sililo, alquilo o acilo) a través de reacciones de sililación, alquilación y acilación respectivamente, aunque en menor medida, también se pueden formar derivados cíclicos o quirales [174-176]. De esta forma, se disminuye la polaridad de los analitos y se mejora la resolución cromatográfica ya que se incrementa la estabilidad térmica, la volatilidad, se evita la formación de picos indeseables, colas y las adsorciones irreversibles en la columna debido a la formación de enlaces de hidrógeno. Además, se modifica indirectamente la sensibilidad del detector y su poder de discriminación, introduciendo en el analito grupos orgánicos que mejoran la detectabilidad y que introducen patrones de fragmentación muy característicos que facilitan el análisis cualitativo y cuantitativo [175, 176].

Estas reacciones se suelen llevar a cabo en sistemas precolumna y de forma discontinua (*offline*) o aprovechando las altas temperaturas que se alcanzan en el inyector del cromatógrafo [177] aunque en casos más afortunados, las reacciones pueden tener lugar a temperatura ambiente [174]. Cuando se emplea la microextracción en fase sólida (SPME) como técnica de extracción las posibilidades para realizar la derivatización aumentan y se explican detalladamente en la sección 4. A continuación, se describe más en detalle las reacciones de derivatización empleadas en esta Tesis y que han sido la derivatización empleando reactivos sililantes y acilantes.

3.1.1.A Derivatización mediante reactivos sililantes

La reacción de sililación consiste en la sustitución de un hidrógeno activo de un grupo funcional (-OH, -SH o -NH) por un grupo sililo (átomo de silicio trisustituído). El mecanismo de reacción se lleva a cabo a través de una sustitución nucleófila tipo SN_2 mediante un ataque nucleofílico al silicio. Para mejorar la reactividad hacia ciertos grupos como pueden ser las aminas secundarias se puede añadir un catalizador (p. ej. 1 % de trimetilclorosilano, TMSC) generalmente ya disuelto en la mezcla comercial. El derivado sililado formado es muy volátil con lo que es un tipo de reacción muy habitual en el análisis de trazas orgánicas y los productos generados a partir del reactivo sililante no generan daños en la columna con lo que no es necesario eliminarlos, si bien algunos de sus

fragmentos y la formación de artefactos puede interferir en la determinación de los compuestos con lo que se requiere un especial cuidado en la separación cromatográfica [175, 176, 178].

En esta Tesis se utilizó una reacción de sililación previa a la determinación para la determinación de cannabinoides y NSAIDs. Se utilizaron para ello dos reactivos diferentes: N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) y N-(*tert*-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA). El primero de ellos introduce en la molécula un grupo trimetilsililo (TMS) mientras que el segundo introduce un grupo más voluminoso, el *tert*-butildimetilsililo, (TBDMS) que genera mayor impedimento estérico y consigue derivados más estables en el tiempo [174]. Uno de los principales inconvenientes de los reactivos sililantes es que la reacción no puede tener lugar en un disolvente prótico ya que el propio derivatizante reaccionaría con él y por consiguiente, tampoco se puede realizar en muestras acuosas de forma directa. A continuación, se muestra la reacción que tiene lugar de forma genérica en la figura II.8. Los espectros de masas en EI para los derivados sililados se caracterizan por una débil presencia del ión molecular. En el caso de los TMS-derivados se observa las pérdidas de $m/z = 15$ correspondientes a los grupos metilos con lo que, de forma general, uno de los fragmentos más abundantes es el $[M-15]^+$, mientras para los TBDMS-derivados se corresponde con el fragmento $[M-57]^+$ (debido a la pérdida de un grupo *tert*-butilo).

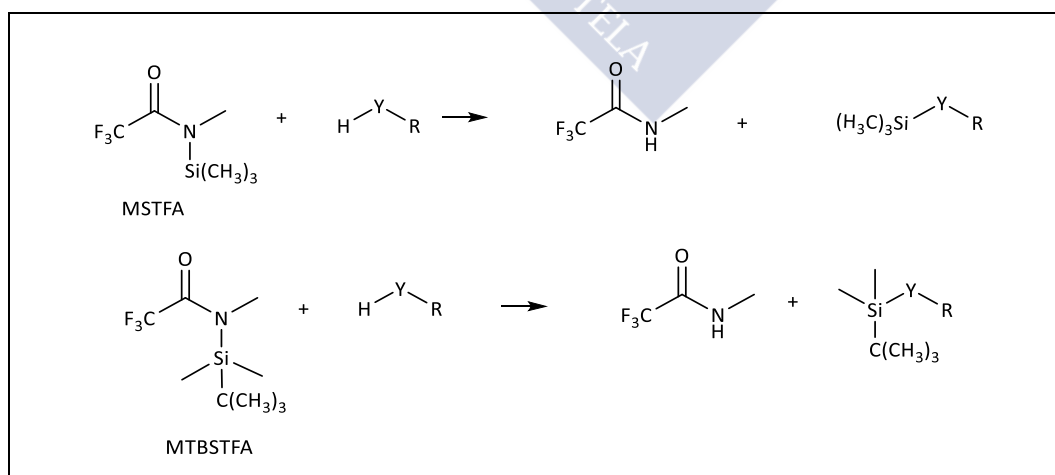


Figura II.8. Reacción genérica de derivatización de los reactivos sililantes que se han empleado en esta Tesis. Y = O, S, COO, NH, NR'; R y R' = arilo o alquilo.

3.1.1.B Derivatización mediante reactivos acilantes

Las reacciones de acilación consisten en la introducción de un grupo acilo como sustitución de un hidrógeno activo (-OH, -COOH, -NH, -SH) para dar lugar a los correspondientes ésteres, amidas y tioésteres.

Estas reacciones se pueden llevar a cabo en medio acuoso de forma rápida y con un alto rendimiento. Además, los reactivos acilantes son mucho más baratos que los sililantes y la estabilidad de los derivados formados es mayor. Los principales reactivos usados para este propósito son los anhídridos de ácido, los haluros de acilo, y otros acilderivados como los alquilcloroformiatos, acilimidazoles y acilamidas [179, 180].

Uno de los reactivos más habituales para llevar a cabo una acilación es el anhídrido acético. Debido a su naturaleza ácida se necesita neutralizar el exceso y los productos ácidos formados, por lo que la reacción tiene lugar en medio básico (en presencia de hidrógenofosfatos, hidrógenocarbonatos, piridina o hidróxido sódico). Se debe tener especial atención a las bases empleadas ya que debido a su poder de corrosión o generación de productos secundarios puede ser necesario eliminarlas para evitar daños en la columna [181, 182]. Por otra parte, la acilación con cloroformiatos ha sido propuesta desde mediados de los 90 como un método muy eficaz para la derivatización de aminas y ha sido ampliamente utilizado en matrices biológicas [176, 180]. Se presentan por tanto, como una alternativa al empleo de anhídrido acético ya que se trata igualmente de una reacción muy rápida, compatible con GC y de alto rendimiento aunque utilizando un reactivo derivatizante más estable. La reacción general que tiene lugar cuando se emplea isobutilcloroformiato (iBCF) se ejemplifica en la figura II.9 y ha sido la elegida en esta Tesis para la derivatización de los ATS.

Los cloroformiatos son poco solubles en medio acuoso y su hidrofobicidad aumenta al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada (butilo > propilo > etilo), razón por la cual es necesario disolverlos previamente en un disolvente miscible con el agua (acetona, acetonitrilo o un alcohol). También es necesario un medio alcalino para su reacción como puede ser piridina o hidrógenofosfato. Por otra parte los cloroformiatos se hidrolizan lentamente en agua con lo cual es necesario optimizar la cantidad a añadir en el medio para una reacción completa [181, 183].

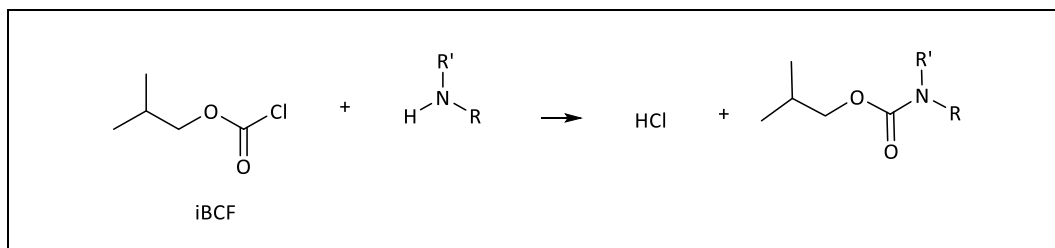


Figura II.9. Reacción genérica de derivatización de una amina con isobutilcloroformiato. R= acilo o alquilo, R'= H o alquilo

3.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía líquida (*liquid chromatography, LC*) se basa en la distribución selectiva de los analitos entre una fase sólida y una fase líquida [184]. El uso de columnas cromatográficas con tamaños de partículas inferiores a las 5 μm y sistemas de alta presión ha dado lugar a lo que se conoce como cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography, HPLC* o simplemente *LC*) y, actualmente, es una de las técnicas más usadas, en especial para el análisis de compuestos muy polares o térmicamente inestables ya que no es necesario una reacción de derivatización. Sin embargo la instrumentación necesaria y su mayor complejidad operacional hace que tanto GC como LC sean técnicas complementarias en cualquier análisis.

El desarrollo de interfases que fuesen capaces de conectar un LC con un sistema de alto vacío como el que requerían los espectrómetros de masas fue un punto clave en el éxito de la hibridación de la cromatografía líquida a un espectrómetro de masas (*liquid chromatography coupled to mass spectrometry, LC-MS*) y supuso un hito en la aplicación de LC para el análisis de trazas. La interfase se puede interpretar como la zona en la que las partículas líquidas que salen de la columna a través de una aguja de nebulización son cargadas positiva o negativamente hasta que implosionan en gotas diminutas de iones en estado gaseoso. A continuación, son introducidas en el detector a través de una guía de iones o Q0 sin alterar las condiciones de vacío. Aunque, históricamente han existido otro tipo de interfases, las más usadas a día de hoy son las de presión atmosférica que incluyen: la ionización por electrospray (*electrospray source ionization, ESI*), la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric-pressure chemical ionization, APCI*) y la fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric-pressure photoionization, APPI*). Una vez que la muestra es introducida en el sistema de alto vacío, los analizadores y detectores que se

emplean son los mismos que en GC-MS. A continuación se describe un sistema de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*) con un detector de triple cuadrupolo (QqQ) por ser uno de los más empleados en el análisis medioambiental así como en el desarrollo de metodologías para la determinación de BZPs y compuestos relacionados realizada en esta Tesis.

El primer (Q1) y último cuadrupolo (Q3) (figura II.10) actúan como analizadores de masas, mientras el segundo de ellos (Q2) funciona como celda de colisión. Para que la fragmentación tenga lugar en el Q2 es necesario que se produzca un fenómeno conocido como fragmentación inducida por colisión (*collision-induced dissociation, CID*) y es necesario la presencia de un gas inerte (Ar o N₂) para llevarla a cabo. Al igual que en un cuadrupolo sencillo se puede trabajar en modos SIM y SCAN en cada uno de los dos cuadrupolos para obtener MS/MS de iones producto, de iones precursores o monitorización de pérdidas neutras. Sin embargo, la baja sensibilidad en SCAN de estos detectores asociada a la baja resolución de masas y a la supresión de señal que tiene lugar en la interfase hace que estas metodologías de barrido no sean muy empleadas. Por ello se emplea el modo conocido como monitorización de reacciones múltiples (*multiple reaction monitoring, MRM*). Su modo de trabajo se basa en seleccionar uno o varios iones precursores en el Q1 que son fragmentados en Q2 y al llegar a Q3 solo se registran determinados iones producto de forma que ambos cuadrupolos (Q1 y Q3) trabajan en modo SIM. Esta configuración es muy sensible y selectiva cuando se usa LC-MS/MS ya que permite eliminar gran parte del ruido de fondo y una identificación más segura de los compuestos al relacionar un único precursor con uno o varios fragmentos característicos.

3.3 PRINCIPALES TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN PARA LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS

3.3.1 DERIVADOS DEL CANNABIS Y DE LAS SUSTANCIAS DE TIPO ANFETAMÍNICO

La técnica de determinación por excelencia para la determinación de drogas de abuso es la LC generalmente acoplada a detectores muy sensibles como pueden ser los

espectrómetros de masas o masas en tándem (LC-MS o LC-MS/MS). Estos analitos se encuentran en concentraciones de ng L^{-1} en el medio ambiente por lo que los intentos de determinarlos sin una etapa previa de extracción y/o concentración no han sido muy fructíferos, fracasando en la mayoría de los casos debido a los bajos LODs requeridos para este tipo compuestos [88, 92, 185]. Por lo tanto, en la gran mayoría de aplicaciones medioambientales se realiza una etapa previa de extracción y concentración, como se detalla en la sección 4.

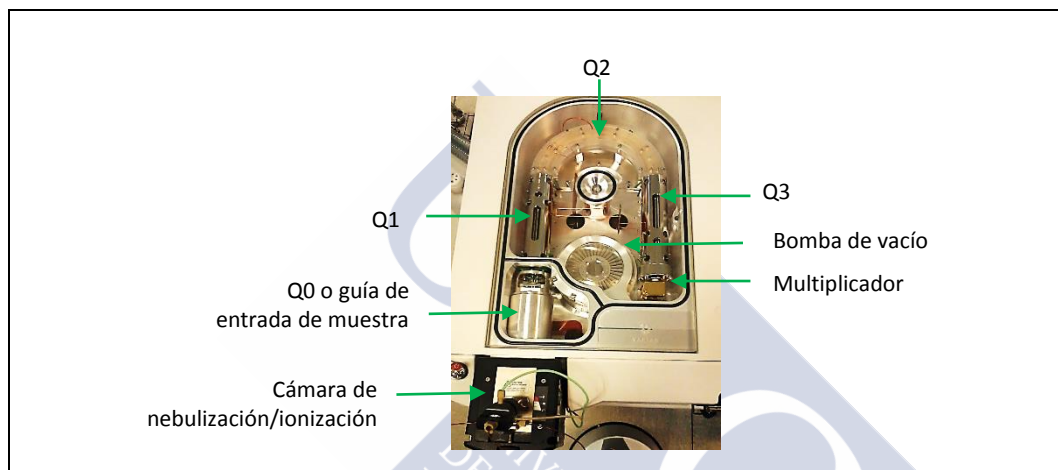


Figura II.10. Imagen de un detector de triple cuadrupolo (QqQ) y sus partes más importantes.

En la tabla II.11 se recogen algunas de las metodologías que analizan cannabinoides y ATS usando LC-MS/MS así como algunos de los parámetros más representativos. Se puede observar que el uso de sistemas de cromatografía líquida ultra rápida (*ultra(high)performance liquid chromatography, U(H)PLC*) en el que se emplean partículas de tamaño menores que en la LC convencional (típicamente $1.7 \mu\text{m}$ frente a $2.7\text{-}5 \mu\text{m}$) se está consolidando cada vez más en el análisis de drogas de abuso debido principalmente al menor tiempo de análisis y a una mayor sensibilidad [30, 82, 102], a pesar de tratarse de una instrumentación con un manejo más complejo y que necesita de equipos más robustos y costosos. En cuanto a los sistemas de determinación, la configuración QqQ es con diferencia la más usada para la determinación de cannabinoides y ATS.

Tabla II.11. Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para el análisis de cannabinoides y ATS en muestras acuosas usando LC-(ESI+)-MS/MS como método de determinación.

Analitos ^a	Matriz	Extracción	Separación	Columna	Fase móvil (modificador)	Analizador	IQL ng mL ⁻¹	LOQ ng L ⁻¹	Ref
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R, S	SPE	U(H)PLC	Aquity UPLC BEH C18 (150 x 1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/MeOH (CH ₃ COOH)	QqQ	0.1-0.5	0.5-6	[82]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R	SPE	HPLC	XTerra MS C18 (100 x 2.1 mm, 3.5 µm)	H ₂ O/ACN (CH ₃ COOH/TEA)	QqQ ^b	10-26 ^d	0.6-9	[29]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA	S	SPE	HPLC	Sunfire C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH/HCOONH ₄)	QqQ	0.04-1.5 ^d	0.1-5	[28]
THC, THCCOOH	R, S	SPE	U(H)PLC	Acquity BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH/HCOONH ₄)	QqQ	0.08-0.2 ^d	7-13	[30]
AMP, MAMP, MDA, MDMA	R	SPE	HPLC	Genesis C18 (150 x 3 mm, 4 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH)	QqLIT	--	3-22	[94]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R, S	SPE	U(H)PLC	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH/HCOONH ₄)	QqQ	--	2-8000 ^f	[85]
AMP, MAMP, MDMA	R	SPE	HPLC	Luna HILIC (150 mm x 3 mm, 5 µm)	H ₂ O/ACN (CH ₃ COONH ₄)	QqQ	--	1-2	[186]
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R, S	SPE	HPLC	Halo C18 (100 x 2.1 mm, 2.7 µm)	H ₂ O/MeOH (CH ₃ COONH ₄)	QqQ	--	2-9 ^f	[187]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R, S	SPE	HPLC	Nucleosil 100-3 C18 HD (125 x 2 mm, 3 µm)	H ₂ O/MeOH (CH ₃ COONH ₄)	QTOF ^b	2-10 ^d	4-50	[86]
THCCOOH, AMP, MDMA	R	SPE	HPLC	Synergy Polar-RP (150 x 3 mm, 4 µm)	H ₂ O/MeOH (CH ₃ COOH)	QqQ	--	1-177	[89]
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R, S	DI	HPLC	Zorbax Eclipse XDB C8 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH)	QqLIT	0.15-0.5 ^d	10-300	[185]

Tabla II.11 (cont.).

Analitos ^a	Matriz	Extracción	Separación	Columna	Fase móvil (modificador)	Detección	IQL ng mL ⁻¹	LOQ ng L ⁻¹	Ref
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R	SPE	HPLC	XBridge C18 (150 x 2.1 mm, 3.5 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH)	Orbitrap	0.7-36 ^d	4-360	[188]
AMP, MAMP, MDMA, MDEA	R	DI/SPE	HPLC	Restek Viva PFPP (10 x 2.1 mm, 5 µm) Restek Ultra IBD (10 x 2.1 mm, 3 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH/CH ₃ COONH ₄)	QqQ	0.01-0.1 ^e	0.2-1	[92]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDMA	R, S	DI	HPLC	Synergi Hydro RP C18 (150 x 2 mm, 2.5 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH/HCOONH ₄)	QqQ	--	20-100	[88]
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R	DI-LVI	HPLC	Atlantis T3 C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	H ₂ O/ACN/MeOH (CH ₃ COOH)	QqQ	0.001-0.002	2.5-10	[93]
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R, S	SPE	U(H)PLC	Acquity BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH/HCOONH ₄)	QqQ	0.01-0.1	0.9-2.1	[102]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDMA	R	SPE <i>Online</i>	HPLC	Purospher Star RP18 (125 x 2 mm, 5 µm)	H ₂ O/ACN	QqLIT ^b	--	0.7-3.4	[95]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R	SPE	HPLC	XBridge Phenil (150 x 3 mm, 3 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH/HCOONH ₄)	QqQ ^b	--	5-20	[97]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	R	SPE	U(H)PLC	Kinetex PFP (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH)	QqQ	--	0.3-60	[96]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDEA, MDMA	R	SPE <i>Online</i>	HPLC	HypersilGold aQ (150 x 2.1 mm, 3 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH/HCOONH ₄)	Orbitrap ^c	--	2-6 ^f	[189]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDMA	R	SPE	U(H)PLC	Kinetex C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH)	QqQ/ QTOF	--	1	[100]

^a Sólo se recogen los analitos estudiados en esta Tesis. ^b ESI (-) para la determinación de THC y/o THCCOOH. ^c Cuantificación empleando el modo MS. ^d IQL estimado a partir de los pg inyectados teniendo en cuenta el volumen de inyección. ^e IQL estimado a partir del límite de detección instrumental (ILD). ^f LOQ estimado a partir del LOD. R: agua residual (influente y/o efluente), S: agua superficial (río y/o lago). DI: Inyección directa, LVI: inyección de grandes volúmenes, SPE: extracción en fase sólida, ACN: acetonitrilo, MeOH: metanol, TEA: trietilamina, IQL: límite de cuantificación instrumental.

En menor medida se han empleado otros sistemas de baja resolución tipo QqLIT (en el que el tercer cuadrupolo es sustituido por una trampa de iones) [94, 95] o espectrómetros de masas de alta resolución (tipo Orbitrap o QTOF) [86, 188-190]. Éstos últimos han sido empleados en reducidas ocasiones con fines cuantitativos debido a menor sensibilidad y mayor coste. Sin embargo, son una herramienta indispensable cuando se trata de análisis cualitativo no dirigido (*screening*) y en la búsqueda de metabolitos y productos de degradación [86, 148, 188, 190, 191].

A pesar de los trabajos ya publicados, uno de los principales inconvenientes para detectar cannabinoides por LC-MS/MS es que los LOQs son relativamente altos y es posiblemente una de las principales razones por las que no han sido incluidos en algunos estudios centrados en la determinación de drogas de abuso en aguas [87, 111, 192] (y tabla II.11), a pesar de ser las sustancias estupefacientes más consumidas en el mundo. Aparentemente, la presencia de un grupo ácido favorece la ionización negativa, permitiendo la monitorización del ión precursor $[M-H]^-$, sin embargo a la vista de los datos recogidos en la tabla II.11, su determinación se ha llevado a cabo tanto en modo positivo como negativo ya que también es posible una ionización a través de los grupos carboxilo y/o alcohol. El uso de APCI o APPI (desarrolladas posteriormente a ESI) no ha sido descrito para el análisis de cannabinoides en muestras ambientales pero podría tratarse de métodos alternativos a ESI ya que son menos susceptibles de sufrir efectos de matriz, sin embargo es posible que por tratarse de técnicas de ionización suaves no produzcan una ionización lo suficientemente eficaz para estos compuestos [193].

El empleo de GC-MS para el análisis de drogas de abuso en matrices medioambientales no es muy habitual debido a su polaridad. Además los ATS presentan unos iones de fragmentación de relación m/z muy baja (típicamente m/z 44, 58 y 91) y son altamente susceptibles de sufrir interferencias en el análisis por GC. Para solventar ambos problemas se recurre a metodologías de preparación de muestra muy selectivas y al uso de derivatizaciones para conseguir unos LODs que permitan ser detectados en los niveles en los que se encuentran en el medio ambiente (entre 2 y 500 ng L⁻¹). El único trabajo publicado hasta la realización del trabajo de esta Tesis había sido el desarrollado por González-Mariño et al. [99] en el que se determinaban conjuntamente cannabinoides, ATS y otras doce drogas ilegales en muestras acuosas.

Tabla II.12. Resumen de las condiciones de derivatización empleadas en la bibliografía para la determinación de cannabinoides y ATS en muestras líquidas de origen biológico empleando GC-MS como método de determinación.

Analitos ^a	Matriz	Extracción	Tipo deriv.	Derivatizante (catalizador)	T ^a (°C), tiempo (min)	Analizador (modo de trabajo)	LOQ (µg L ⁻¹)	Ref
AMP, MAMP	O, S	LLE/SPE	On- column	MBTFA	230 °C,	Q (SIM)	30-700 ^b	[194]
THCCOOH	O	LLE	Offline	MSTFA (1 %TMSC)	70 °C, 20 min	Q (SIM)	10 ^b	[195]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDEA	Sa	LLE	Offline	MSTFA	100 °C, 30 min	Q (SIM)	2-21	[196]
THC, THCCOOH	P	SPE	Offline	BSTFA (1 %TMSC)	T ^a amb, 30 min	Q (SIM)	0.8-0.9	[197]
THC, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	Sa	SPE	Offline	HFBA para ATS MTBSTFA para THC	T ^a amb, 5min (ATS) 85 °C, 30 min (THC)	Q (SIM)	2-25	[198]
THC, AMP, MAMP	Sa	DI-SPME	En la muestra	BCF (NaHCO ₃ /K ₂ CO ₃)	T ^a amb, 20 min	Q (SIM)	0.5-5	[199]
MAMP, MDMA	O	DI-SPME	En la muestra	HCF (piridina)	90 °C, 20 min	IT (SCAN)	100-500	[200]
AMP, MAMP	O	DI-SPME	En la muestra	PCF (KHCO ₃ /K ₂ CO ₃)	T ^a amb, 14 min	Q (SCAN)	167 ^b	[201]
AMP, MAMP	O	LLE	En la muestra	PCF (KHCO ₃ /K ₂ CO ₃)	T ^a amb, 2 min	IT (SCAN)	150-100	[202]
THC, THCCOOH	Su, P, S	LLE	Offline	MTBSTFA	80 °C, 30 min	Q (SIM)	2-10	[203]
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	O	HS-SPME	On-fiber	HFBA/HFBCL	95 °C, 30 min	IT (SIS)	0.05-0.6	[204]
AMP, MAMP, MDA, MDMA	O	HS-SPME	On-fiber	TFAA	60 °C, 20 min	Q (SIM)	10-20	[205]
AMP, MAMP	Sa	DI-SPME	En la muestra	PCF (Na ₂ CO ₃)	T ^a amb, 20 min	Q (SIM)	2-7 ^b	[206]

^a Sólo se recogen los analitos estudiados en esta Tesis. ^b LOQ calculado a partir del LOD. O: orina, S: sangre, Sa: saliva, Su: suero, P: plasma, LLE: extracción líquido-líquido, DI-SPME: SPME en modo de inmersión, HS-SPME: SPME en modo de espacio de cabeza, HFBA: ácido heptafluorobutírico, HFBCL: cloruro de ácido heptafluorobutírico, TFAA: anhídrido trifluoroacético, MBTFA: N-metil-bis(trifluoroacetamida), BCF: butilcloroformiato, HCF: hexilcloroformiato, PCF: propilcloroformiato, T^a amb: temperatura ambiente, SIS: select ion storage (modo de análisis equivalente a SIM, pero empleando una trampa de iones para llevarlo a cabo).

En dicho trabajo los compuestos eran aislados y concentrados empleando extracción en fase sólida (*solid-phase extraction, SPE*). Posteriormente, el extracto (100 μL) se derivatizaba añadiéndole el mismo volumen de MSTFA y se mantenía a 80 °C durante 1 hora. El extracto derivatizado se inyectaba en un GC-MS permitía su determinación en modo MS/MS con LODs inferiores a 12 ng L⁻¹ para agua residual y en el rango 0.8-2 ng L⁻¹ para agua superficial.

En contraposición, en el ámbito biológico, cannabinoides y ATS han sido ampliamente determinados empleando GC-MS(/MS) con o sin derivatización ya que los compuestos se encuentran en concentraciones que superan los cientos de $\mu\text{g L}^{-1}$ o ng mg⁻¹ [207] en este tipo de matrices y los LOQs son mayores que los requeridos en el caso de muestras medioambientales (ver tabla II.12). Los reactivos derivatizantes más empleado en el ámbito clínico/forense son reactivos sililantes (MSTFA, MTBSTFA y N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, -BSTFA-) y la derivatización tiene lugar *on fiber* (si se emplea SPME para su extracción, ver sección 4) o en modo *offline*. La temperatura de derivatización oscila entre los 70 y 90 °C con tiempos de reacción próximos a los 30 minutos o incluso menores si se emplea el modo *on fiber*. Por otra parte los reactivos acilantes derivados de los cloroformatos (butil, propil y hexilcloroformiato) también tienen una elevada aceptación debido a la posibilidad de realizar una derivatización en la propia muestra (*in situ*) de forma muy rápida y con muy poca cantidad de reactivo, aunque los LOQs obtenidos acostumbran a ser un poco mayores que cuando se emplean reactivos sililantes.

3.3.2 BENZODIACEPINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS

Al igual que para la determinación de drogas de abuso, la determinación de BZPs y compuestos relacionados en muestras medioambientales se ha llevado a cabo mayoritariamente usando sistemas de LC-MS/MS, quedando la GC relegada al análisis de muestras biológicas en las que la sensibilidad necesaria es menor y por tanto prescindiendo en ocasiones de realizar una derivatización [208]. En la tabla II.13 se recogen los principales métodos que analizan un número significativo de BZPs en muestras medioambientales.

Tabla II.13. Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para el análisis de BZPs y compuestos relacionados usando LC-MS/MS como método de determinación.

Análitos ^a	Matriz	Extracción	Separación	Columna	Fase móvil (modificador)	Analizador	IQL ng mL ⁻¹	LOQ ng L ⁻¹	Ref
ALP, BROM, CHLOR, DIA, LOR, OXA, ZOLP	R	SPE	U(H)PLC	Aquity BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH/HCOONH ₄)	QqLIT	---	0.02-15	[114]
BROM, DIA, NDIA, OXA, TEM	R, S	SPE	HPLC	Synergi Polar-RP (150 x 3 mm, 4 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH/HCOONH ₄)	QqQ	---	1-20	[84]
ALP, FLUN, MID, MPHEN, OXA, ZOLP	R	SPE Online	HPLC	Hypersil Gold AQ (50 x 2.1 mm, 5 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH)	QqQ	----	1-10	[111]
BROM, DIA, LOR	S	SPE	HPLC	Zorbax Eclipse XDB-C18 (75 x 4.6 mm, 3.5 µm)	H ₂ O/MeOH (CH ₃ COOH)	QqLIT	---	2-4	[112]
CHLOR, DIA, NDIA, OXA, TEM	R, S	SPE	U(H)PLC	Aquity BEH C18 (150 x 1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/MeOH (CH ₃ COOH)	QqQ	0.1-0.5	0.5-21	[82]
DIA, MPHEN, NDIA, OXA, TEM	R	SPE	HPLC	XBridge C18 (150 x 2.1 mm, 3.5 µm)	H ₂ O/MeOH (HCCOH)	Orbitrap	0.7-1.4 ^b	2-20	[188]
ALP, BROM, CHLOR, DIA FLUN, LOR, MID, NDIA, OXA, TEM, 7AFLUN	R	SPE	U(H)PLC	Kinetex PFP (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH)	QqQ	----	0.5-24	[96]
DIA, LOR	R, S	SPE	HPLC	Purospher Star RP-18 (125 x 2.0 mm, 5 µm)	H ₂ O/ACN (HCOOH)	QqLIT	1.3-2 ^b	2.6-24	[209]
ALP, DIA, LOR	R	SPE Online	HPLC	Pursuit C18 (150 x 2.0 mm 4.6 µm)	H ₂ O/MeOH (HCOOH)	QqQ	---	20-26 ^c	[210]
ALP, CLON, OXA, ZOLP	R, S	SPE	HPLC	Hypersil C18 (50 x 2.1 mm, 5 µm)	H ₂ O/ MeOH (HCOOH)	QqQ	0.5-10	0.4-13	[211]
ALP, BROM, DIA, LOR, ZOLP	R, S	SPE	HPLC	Pursuit UPS C18 column (50 x 2.1 mm, 2.4 µm)	H ₂ O/ MeOH (HCOOH)	IT	1-6	3-7	[212]

^a Sólo se recogen los analitos estudiados en esta Tesis. ^b IQL estimado a partir de los pg inyectados teniendo en cuenta el volumen de inyección. ^c LOQ estimado a partir del LOD. R: agua residual (influente y/o efluente), S: Agua superficial (río y/o lago). ACN: acetonitrilo, MeOH: metanol, IQL: límite de cuantificación instrumental.

Hasta el momento no se han encontrado métodos centrados en su determinación de forma exclusiva ya que suelen encontrarse en metodologías multianalito junto con drogas de abuso o fármacos principalmente. Al igual que en el análisis de drogas de abuso la separación empleando U(H)PLC está cada vez más implantada debido al ahorro en el tiempo de análisis y en reactivos.

Debido a la estructura de las BZPs la técnica de ionización empleada es ESI en modo positivo usando casi siempre fases móviles acidificadas que favorezcan la ionización y columnas de fase reversa tipo C18 (ver tabla II.13). Los LOQs se encuentran entre 0.5-20 ng L⁻¹, no apreciándose diferencias significativas entre los diferentes analizadores empleados, bien sea QqQ, QqLIT o Orbitrap, siendo en las muestras más complejas (influyente y efluente) donde se encuentran LOQs un poco mayores.

3.3.3 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

La determinación de NSAIDs a través de LC-MS/MS ha ganado cada vez más importancia en el campo medioambiental a pesar de los efectos de matriz que se producen durante la ionización y la necesidad de emplear adiciones estándar o patrones marcados isotópicamente para compensarlos en la mayoría de los casos [132, 213-218]. Por otra parte la baja fragmentación de los compuestos, en particular del IBU y KET que no poseen una segunda transición empleada para la confirmación puede dar lugar a resultados equívocos [131, 134, 213] y es necesario otro parámetro de identificación para cumplir con la Directiva Europea 2002/657/EC [219] que regula los estándares de calidad de los métodos analíticos.

En LC-MS/MS, los NSAIDs se separan empleando columnas de fase reversa tipo C12 o C18 y los detectores más empleados han sido los QqQ empleando ionización negativa excepto en el método propuesto por Hilton et al. [134] en el que el DIC era detectado en modo positivo. Los LOQs obtenidos en estas metodologías suelen ser inferiores a 100 ng L⁻¹ lo que permite la determinación de NSAIDs a niveles traza en matrices acuosas.

Tabla II.14. Resumen de las condiciones de derivatización empleadas en la bibliografía para la determinación de NSAIDs en muestras ambientales empleando GC-MS como técnica de determinación

Compuestos ^a	Matriz	Extracción	Modo derivatización	Derivatizante (catalizador)	T ^a (°C), tiempo (min)	Analizador (modo de)	LOQ ng L ⁻¹	Ref
IBU, NAP, KET, DIC	R	SPE	Offline	MTBSTFA	60 °C, 60 min	IT (SCAN)	20-50	[123]
IBU, NAP, DIC	S	SPE	Offline	MTBSTFA (1 % TBDMSC)	60 °C, 90 min	Q (SIM)	3-13 ^b	[220]
IBU, NAP, KET, DIC	R	DI-SPME	On fiber	MTBSTFA	40 °C, 20 min	IT (SCAN)	15-40	[221]
IBU, NAP, KET, DIC	R, S	SBSE	En el inyector	MTBSTFA	60 °C, 0.65 min	IT (SCAN)	43-70 ^b	[124]
IBU, NAP, KET, DIC	R, S	SPE	Offline	MSTFA	65 °C, 35 min	Q (SIM)	0.3-40 ^b	[133]
IBU, NAP, KET, DIC	S	SPE	Offline	MSTFA	T ^a amb, 12 h	Q (SCAN)	7-20 ^b	[127]
IBU, NAP, KET, DIC,	R, S	SPE	Offline	Diazometano	T ^a amb, 30 min	Q (SIM)	1-15 ^b	[128]
IBU, NAP	R, S	HS-SPME	En la muestra	DMS y TBA-HSO ₄	70 °C, 55 min	Q (SIM)	1-9	[222]
IBU, DIC	S	US-LLE	En el inyector	TBA-HSO ₄	290 °C, 2.5 min	Q (SIM)	2-10 ^b	[223]
IBU, DIC	R, S	SPE	En el inyector	TMSh	60 °C, 2 min	IT (MS/MS)	300	[224]
IBU,K ET, DIC	S	LLE+DSPE	Offline	BF ₃ (MeOH)	90 °C, 70 min	Q (SIM)	23-40 ^b	[225]
IBU,DIC	R	SPE	Offline	PFBBr (TEA)	110 °C, 60 min	Q (SIM)	2-67 ^b	[226]
IBU, NAP, KET,DIC	R, S	MEPs	En la muestra	EDC (TFEA)	T ^a amb, 15 min	Q (SIM)	11-360	[227]

^a Sólo se recogen los estudiados en esta Tesis. ^b LOQ estimado a partir del LOD R: agua residual (influyente y/o efluente), S: Agua superficial (río y/o lago). SBSE: extracción mediante absorción sobre barras agitadoras, US-LLE: extracción líquido-líquido asistida con ultrasonidos, DSPE: extracción en fase sólida dispersiva, MEPs: microextracción con jeringas empacetas, TBDMSC: *tert*-butildimetilclorosilano, TFEA: hidróxido de trifluoroetilamina, EDC: cloruro de N-(3-dimethylaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, DMS: sulfato de dimetilo, TBA: tetrabutylamonio, TMSh: hidróxido de trimetilsulfonio, PFBBr: bromuro de pentafluorobenzol, MeOH: metanol, T^a amb: temperatura ambiente.

Tradicionalmente, los NSAIDs han sido detectados por GC-MS debido a la robustez de los equipos, su menor precio y elevada disponibilidad en los laboratorios, a pesar de que la derivatización es necesaria para poder obtener unos LOQs aceptables para este tipo de matrices [228]. Para llevarla a cabo se han empleado multitud de reactivos, los más comunes son reactivos sililantes tales como BSTFA [229], MSTFA [127, 133], MTBSTFA [123, 124, 126, 220], (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida) (BSA) [230] y hexametildisilazano (HMDS) con ácido trifluoroacético (TFA) [231]. Entre todos ellos, uno de los más usados es el MTBSTFA debido a que proporciona mayor sensibilidad y mejor forma de pico [126, 232]. Las temperaturas a las que se lleva a cabo la reacción oscilan entre 40 y 70 °C y los tiempos entre 20 y 90 minutos. Por otra parte, es posible ahorrar tiempo y esfuerzo en esta etapa cuando la derivatización se realiza en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases como así lo han realizado varios autores [124, 223, 224, 233].

También se han usado en menor medida (debido a su mayor riesgo y toxicidad) bromuro de pentafluorobenzilo (PFBBBr) [226, 234], hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) [224], derivados del diazometano [128, 135, 235, 236], hidrógenosulfato de tetrabutilamonio (TBA-HSO₄) [136, 223], metanol (MeOH) en medio ácido [225, 237, 238]. En la tabla II.14 se recogen algunos de los métodos más recientes que emplean GC-MS(/MS) y derivatización para la determinación de NSAIDs por considerarse los más relevantes en esta Tesis.



4 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA LOS ANALITOS ESTUDIADOS

Una de las etapas que más tiempo consume en el laboratorio es la etapa de preparación de muestra. Ésta a su vez, se puede dividir en varias subetapas (aunque no siempre es necesario realizarlas todas) como pueden ser filtración, ajuste de pH, aislamiento y preconcentración de los analitos, eliminación de interferencias, evaporaciones, etc. Existen diferentes técnicas para llevar a cabo la preparación de muestra y la selección de una u otra se basa en la confluencia de múltiples criterios como pueden ser la naturaleza de los analitos y de la matriz, los LOQs necesarios, la disponibilidad de instrumentación específica y el conocimiento de las técnicas por parte del operario. Las técnicas de preparación de muestra se pueden clasificar de múltiples formas atendiendo a diferentes parámetros como puede ser el tipo de matriz a la que se aplican, el mecanismo de extracción o el uso de medios de dispersión entre otras. Una de las clasificaciones más amplia, relativa a la extracción de los analitos, es la que atiende a si se trata de técnicas de extracción exhaustivas o no, como se recoge en la figura II.11. Así, las técnicas de extracción exhaustivas tienen como finalidad extraer la totalidad de analito de la matriz que los contiene. Mientras que las técnicas de extracción no exhaustivas se caracterizan por una situación de equilibrio en el que la extracción alcanza su máximo de respuesta cuando se ha llegado al tiempo de equilibrio entre la cantidad de analito presente en la matriz y el ab/adsorbido o disuelto en el medio extractante. En algunas condiciones muy favorables se puede llegar a extracciones de más del 90 % de analitos presentes aunque no es lo habitual. Comúnmente estas técnicas también son conocidas bajo el término de “no cuantitativas” aunque esta denominación puede ser interpretada como que este tipo de técnicas no sirven para realizar la cuantificación de los analitos, lo cual es erróneo.

En esta sección se describirá la SPE como ejemplo de una técnica de extracción exhaustiva y por otra parte técnicas no exhaustivas de (micro)extracción basadas en el equilibrio que usan un extractante sólido (SPME, extracción mediante absorción sobre barras agitadoras, ab/adsorción con polímeros de bajo coste, y extracción con polímeros modificados químicamente). Estas técnicas se caracterizan por su simplicidad y robustez en comparación con otras técnicas que emplean extractantes líquidos con tendencia a

una mayor irreproducibilidad debido a que se pueden formar emulsiones y/o desprendimientos de la fase líquida. Se explicarán sus fundamentos, características y principales parámetros a tener en cuenta durante su aplicación. Además, al final de cada técnica se incluirá una revisión bibliográfica con los aspectos más relevantes de la aplicación a los compuestos estudiados en esta Tesis.

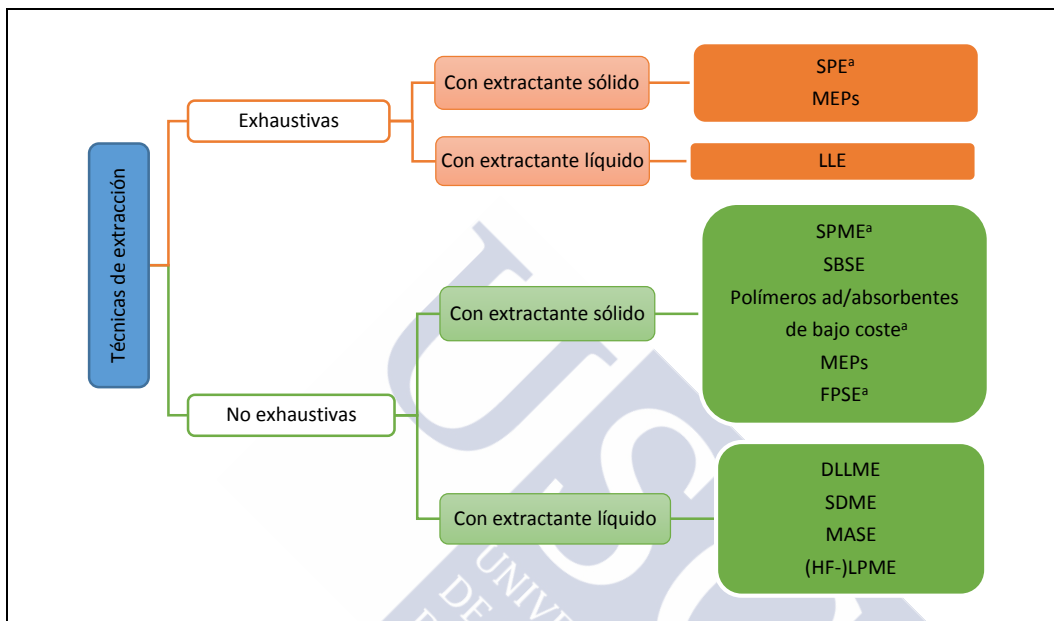


Figura II.11. Clasificación de las técnicas de extracción más relevantes para muestras líquidas en función de la cantidad de analito que pueden extraer de la matriz. ^a Técnicas empleadas durante el desarrollo de esta Tesis. MEPs: microextracción con jeringas empaquetadas (*microextraction in a packed syringe*), LLE: extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*), SBSE: extracción mediante absorción sobre barras agitadoras (*stir-bar sorptive extraction*), FPSE: extracción con polímeros modificados químicamente (*fabric phase sorptive extraction*), DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*), SDME: microextracción con gota (*single-drop microextraction*), MASE: extracción con disolventes asistida con membranas (*membrane assisted solvent extraction*), (HF)-LPME: microextracción en fase líquida con fibra (hueca) (*hollow fiber-liquid phase microextraction*).

4.1 CONSIDERACIONES PREVIAS A LA EXTRACCIÓN DE LOS ANALITOS: ESTABILIDAD Y FILTRACIÓN

La estabilidad de los analitos en las muestras de aguas residual es crucial puesto que al tratarse de compuestos biológicamente activos pueden ser metabolizados o degradados por las bacterias presentes en la muestra (especialmente en el caso de agua residual). Además, la presencia de materia orgánica puede favorecer la adsorción de los analitos sobre ella, de forma que las concentraciones se subestimen cuando se analizan muestras que han estado almacenadas mucho tiempo. A continuación, se recogen los

estudios más relevantes que se han llevado a cabo sobre este tema para los analitos recogidos en esta Tesis.

Existen diferentes estudios que revelan las condiciones de estabilidad y almacenamiento más adecuadas para los cannabinoides. Así, se ha observado una mínima variación en la señal de THCCOOH en muestras de influente después de tres días a pH natural (7.4) y varias temperaturas (4, 10 y 20 °C) [29, 35]. Sin embargo, los resultados aportados por González-Mariño et al. [99] contradicen a los publicados por Castiglioni et al. [29] ya que aportan una disminución en la señal próximo al 40 % en las mismas condiciones (pH 7.4, 4 °C) al tercer día. En ese mismo estudio se evalúa el uso de azida sódica (0.2 %) como preservante y, aunque no evita la degradación total del THCCOOH, sí consigue que su señal sólo disminuya un 25 % respecto a la señal control. En referencia a los ATS, éstos parecen bastante ser estables en agua residual observándose variaciones inferiores al 10 % pasados tres días en muestras almacenadas a su pH natural (7.4) y diferentes temperaturas (4, 10, 20 °C) [29, 34, 35, 99]. Sin embargo los resultados observados por Baker et al. difieren de los de los demás autores al observar un importante incremento en la señal para la AMP cuando la muestra se almacenó sin filtrar a su pH natural (38 % incremento a 2 °C). Los resultados mejoraban cuando la muestra se almacenaba filtrada, refrigerada (a 2 °C) y acidificada a pH 1.8 produciéndose una disminución de la señal del 9 % en 3 días. La acidificación de las muestras (pH ~ 2) es un procedimiento bastante común para evitar degradaciones biológicas [239]. Sin embargo, para el THCCOOH parece que se incrementa su adsorción sobre la materia orgánica y disminuye su presencia en la matriz acuosa [35].

En el caso de ser necesario congelar las muestras (-20 °C) la estabilidad del THCCOOH y los ATS se mantiene hasta tres meses, sin observarse diferencias entre muestras acidificadas o no [93, 189]. Sin embargo para el THC, Heuett et al. [189] observaron una importante disminución en la señal respecto a la señal control (43 % menos) en el primer mes y llegando al 94 % de disminución en 3 meses, que justificaron con la posibilidad de otras vías de degradación [191].

Los estudios para evaluar la estabilidad de BZPs y compuestos relacionados en muestras de agua residual son más escasos y sólo Baker et al. [239] proporcionaron datos

sobre la estabilidad de seis BZPs bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. Para estos compuestos se observan diferentes tendencias; por una parte para OXA y TEM las mejores condiciones de almacenamiento se observaron bajo refrigeración (2 °C) a su pH natural con variaciones en la señal inferiores al 8 % después de 3 días mientras que el resto de los compuestos analizados (NDIA, DIA, CHLOR) eran degradados en menor medida cuando se mantenían acidificados (pH 1.8) a 2 °C, pero aún así, se observaron disminuciones en la señal entre un 5 y 50 %.

Como paso previo a la extracción se suele realizar una filtración con filtros de un tamaño de poro de 0.45 µm para evitar que las partículas disueltas puedan obturar el lecho del material adsorbente y que no se produzca una correcta retención de los analitos. Esta etapa puede conllevar una retención de los analitos en el material de filtración como así han publicado varios autores para el caso de THC, THCCOOH, MPHEN, FLUN y MID cuando empleaban filtros de polipropileno (PP), politetrafluoroetileno (PTFE), fibra de vidrio o Nylon [85, 111, 189, 239].

4.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (*solid-phase extraction, SPE*) es una técnica de extracción exhaustiva que emplea un adsorbente sólido y que surgió a mediados de los años 70, momento en el que la extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction, LLE*) era la técnica predominante para muestras líquidas. En un primer momento la SPE se planteó como una técnica de purificación complementaria a la LLE pero enseguida se descubrió su potencial y poco a poco consiguió desbancarla ya que soluciona algunos de los principales problemas que presentaba la LLE como p. ej. su nula automatización y los altos volúmenes de disolvente orgánico que se necesitaban para conseguir una extracción exhaustiva, entre otros. A día de hoy, la SPE se ha convertido en una de las técnicas más empleadas para la extracción de cualquier tipo de analitos de matrices acuosas y se pueden encontrar numerosas aplicaciones en los campos farmacéuticos, medioambientales, alimentarios e industriales [240-243]. Además, forma parte de diferentes métodos de análisis oficiales de la EPA [244] o de la Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization, ISO*) [245].

La SPE permite realizar simultáneamente la extracción, limpieza y concentración de los analitos, lo que ahorra tiempo y esfuerzo en el análisis. En su descripción más elemental la SPE se puede considerar como una separación cromatográfica en la que la fase móvil (muestra acuosa) atraviesa la fase estacionaria (material adsorbente). Los compuestos presentes en la muestra tendrán una diferente afinidad por la fase estacionaria en función de su estructura con lo que serán retenidos en mayor o menor medida. Finalmente, los analitos de interés serán recuperados en una segunda etapa usando un pequeño volumen de una o varias fases móviles de poder eluotrópico creciente y posteriormente concentrados en caso de ser necesario. La cantidad de muestra que se suele emplear oscila entre 50-500 mL en la mayoría de aplicaciones aunque se puede llegar a pasar a través del cartucho varios litros de muestra. Los volúmenes de disolvente empleados en SPE para la elución son relativamente bajos (2-10 mL) en comparación con los usados en LLE, aunque mayores que los empleados en las técnicas de microextracción [172, 246-248]. Esta técnica se puede realizar manualmente o empleando sistemas robotizados (SPE *offline*) que realizan las etapas de acondicionamiento, carga de muestra y elución de forma automática y desatendida con lo que se reduce considerablemente el tiempo del operario en el laboratorio y las posibilidades de error.

Con el paso de los años también se han diseñado sistemas que permiten acoplar la SPE directamente al instrumento de medida con lo que se minimiza el riesgo de contaminación de la muestra, la pérdida de analitos por volatilización durante la etapa de evaporación y la concentración del eluato [249]. El acoplamiento *online* SPE-LC-MS(/MS) tiene especial interés en cuanto a la posibilidad de obtener análisis de compuestos a niveles trazas con la mínima manipulación y usando una reducida cantidad de muestra (1-10 mL) en contraste con la SPE *offline* que requiere de volúmenes de muestra mayores ya que solo una pequeña alícuota del extracto final es inyectada. Este acoplamiento es uno de los más robustos, debido en parte a la buena compatibilidad de los disolventes usados en la extracción con la propia fase móvil usada en el sistema cromatográfico y, aunque se han probado diferentes configuraciones SPE-GC-MS(/MS) no han sido igual de exitosas [247, 249]. Sin embargo debido al bajo coste y poca instrumentación necesaria la configuración *offline* sigue siendo la preferida en la mayoría de los laboratorios.

4.2.1 MODO DE TRABAJO

La SPE consta de cuatro etapas bien diferenciadas que se muestran en la figura II.12 y que se describen a continuación [172, 246].

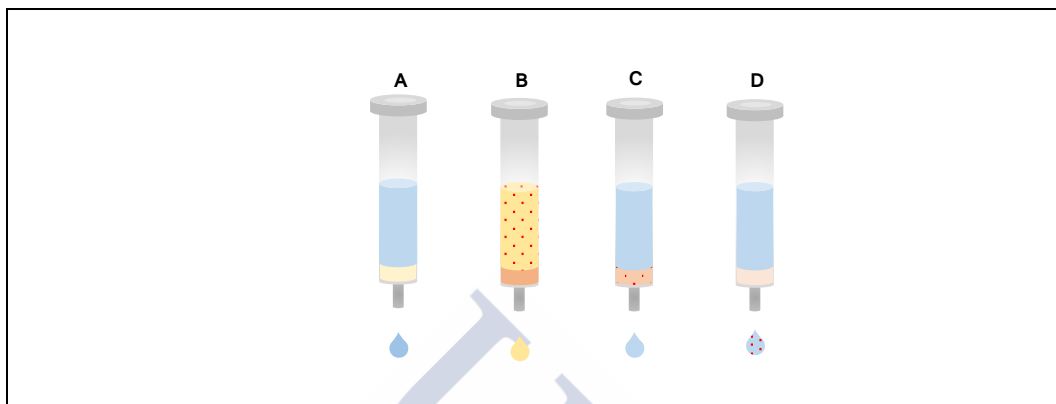


Figura II.12. Etapas en la extracción mediante SPE. A: acondicionamiento, B: retención, C: lavado, D: elución.

- **Acondicionamiento y activación (A):** Primeramente se pasa un disolvente orgánico adecuado para solvatar la fase y/o retirar interferencias que puedan estar presentes. Lo más habitual es emplear el mismo disolvente que más tarde se usará durante la elución. A continuación, se pasa a través del cartucho agua ultrapura al pH al que se encuentra la muestra para eliminar los restos de disolvente orgánico que hayan podido quedar retenido en la fase, de esta forma el adsorbente se encuentra solvatado por una disolución acuosa similar a la muestra que va a ser cargada a continuación.

- **Retención (B):** En esta etapa, la muestra atraviesa el cartucho de SPE y los analitos y ciertas interferencias quedan retenidos en la fase estacionaria, mientras que otras no son retenidas de forma significativa y son eluidas directamente al paso de la muestra. Este proceso se puede realizar a gravedad (si el volumen de muestra no es muy alto), ayudados por una bomba de vacío, ejerciendo presión o por centrifugado facilitando la correcta interacción entre los analitos y la fase estacionaria.

- **Lavado o *clean-up* (C):** Aunque esta etapa no siempre se realiza, en ocasiones es conveniente realizar un lavado del cartucho con uno o varios disolventes de fuerza de elución creciente para eliminar todas las interferencias posibles sin eluir los analitos adsorbidos en la fase estacionaria y obtener así un extracto lo más limpio posible.

- **Elución (D):** Finalmente se pasa un disolvente que interaccione más fuertemente con los analitos que las partículas del adsorbente y así se rompen las interacciones analito-fase estacionaria de forma que se produce su elución. Normalmente, antes de la elución se realiza una etapa previa de secado para eliminar todo el agua que haya podido quedar retenida en la fase estacionaria y que pueda interferir en la elución de los analitos. Finalmente el disolvente con los analitos se puede evaporar a un menor volumen y almacenarse para su posterior análisis [172, 246].

4.2.2 ADSORBENTES

La elección del adsorbente se basa en primer lugar en los grupos funcionales presentes en los analitos ya que son los que van a interactuar con la fase estacionaria. Además se debe prestar importancia al volumen de muestra y a la naturaleza de la matriz ya que condicionará la cantidad de fase a utilizar. Es importante seleccionar una cantidad de fase (capacidad del cartucho) que garantice suficientes posiciones activas para la retención de todas las moléculas de analito y que no se produzca su salida durante la etapa de carga de muestra. Esto ocurre principalmente en muestras con un elevado contenido orgánico, ya las moléculas interferentes bloquean las posiciones destinadas a los analitos y por lo tanto la capacidad del cartucho es menor de la esperada. También se debe tener en cuenta el volumen de muestra que se va a emplear ya que cuando la interacción de los analitos con la fase estacionaria es relativamente débil, los analitos pueden ser eluidos debido al propio paso de la muestra. Cuando ocurre esto, se dice que se alcanzado el volumen de rotura del analito [246, 248, 250, 251].

En los primeros años de aplicación de SPE los adsorbentes más empleados fueron los óxidos inorgánicos, el carbón grafitizado y las sílices enlazadas, pero fueron progresivamente sustituidos por adsorbentes poliméricos debido a su mayor estabilidad frente a pH extremos, la ausencia de grupos silanoles residuales y el elevado volumen de rotura con lo que era fácil detectar analitos a niveles mucho más bajos, del orden de los ng L^{-1} . A continuación se describen los adsorbentes más empleados en SPE.

- **Óxidos inorgánicos:** Los más empleados son la sílice, la alúmina y el Florisil (silicato de magnesio sintético). Estos adsorbentes actúan reteniendo compuestos

susceptibles de formar enlaces por puente de hidrógeno (ácidos, alcoholes, aminas...) y de forma más débil a los demás grupos funcionales. Actualmente se suelen usar en etapas de limpieza secundarias en casos de muestras muy complejas.

- **Carbón grafitizado:** El carbón grafitizado (*graphitized carbon black, GCB*) o carbón negro poroso (*porous graphitic carbon, PGC*) se caracteriza por una retención inespecífica tanto de compuestos polares como apolares. Uno de los principales problemas que plantea es la unión irreversible a compuestos muy polares por lo que muchas veces es difícil recuperar los analitos de forma exhaustiva.

- **Sílice enlazada:** Se caracteriza por uniones silil-éter y en función del grupo enlazado se pueden establecer adsorbentes de fase normal (cianopropilsilano, CN o aminopropilsilano, NH₂), de fase reversa (octilsilano, C8 u octadecilsilano, C18) o fases de intercambio aniónico (trimetilamino propilsilano, SAX o bencenosulfonil propilsilano, SCX). Si el adsorbente enlazado es una fase normal, el mecanismo de retención se basa principalmente en enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo, mientras que en las sílices enlazadas con adsorbentes de fase reversa la principal interacción entre los analitos y la fase estacionaria ocurre a través de fuerzas de Van der Waals (también llamadas interacciones no polares, hidrofóbicas o interacciones de fase reversa) y ocasionalmente a través de interacciones secundarias como enlace de hidrógeno y dipolo-dipolo. Las partículas que conforman estos adsorbentes suelen tener un tamaño de 40 μm y un diámetro de poro de unos 60 Å. Entre algunos de los inconvenientes de las sílices enlazadas se encuentran su baja estabilidad a pH extremos y la presencia de grupos silanoles libres que ejercen interacciones indeseables.

- **Adsorbentes poliméricos:** Los adsorbentes poliméricos basan su mecanismo de retención en fuerzas de Van der Waals y enlaces π - π con los anillos presentes en la estructura polimérica. Uno de los primeros adsorbentes poliméricos disponible fue el formado por copolímeros macroporosos de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) caracterizado por una alta pureza y gran superficie específica (100-800 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$). Sin embargo, aunque se había aumentado considerablemente la capacidad respecto a los materiales empleados anteriormente, el PS-DVB seguía presentando problemas para la retención de los compuestos más polares.

La investigación en nuevos materiales ha seguido creciendo buscando mayores capacidades y mejorando la retención, por ello en las últimas décadas han surgido los adsorbentes formados por copolímeros N-vinilpirrolidona-divinilbenceno (VP-DVB) entre otros con una mayor capacidad (hasta $2000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), que combinan la presencia de macroporos y microporos [252]. Además se han modificado los grupos funcionales presentes en el polímero para lograr así una mayor retención de compuestos polares. Inicialmente fue Waters Corporation la compañía que desarrolló, patentó y comercializó estas fases, sin embargo otras compañías como Agilent Technologies, Phenomenex, Applied Separations, Merck, Supelco o IST también se encargan de desarrollar y comercializar nuevos adsorbentes poliméricos.

Los adsorbentes Oasis HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*) fueron los primeros en comercializarse por Waters Corp. y a día de hoy se puede decir que son los que mayor número de aplicaciones poseen. Están formados por una red polimérica de VP-DVB y contienen en su estructura una parte hidrofílica y otra hidrofóbica como se muestra en la figura II.13 con lo que pueden retener tanto analitos polares como apolares. De esta forma se mejora la retención de ambos tipos de compuestos y se obtienen elevadas recuperaciones para analitos de propiedades muy distintas. Además, el secado del lecho del adsorbente no es tan crítico como puede ser en el caso de las sílices enlazadas ya que al tratarse de un copolímero no es susceptible de la formación de canales preferentes de elución con lo que el trabajo requiere una menor atención y se obtienen extracciones más eficaces y reproducibles.

Más tarde, los adsorbentes Oasis HLB modificaron su estructura introduciendo en la red polimérica grupos funcionales que actuaban como intercambiadores de cationes o aniones fuertes y se les dio el nombre genérico de “polímeros de modo mixto”. En particular, se introdujo una amina cuaternaria como intercambiador de aniones y un grupo sulfónico como intercambiador de cationes y se les denominó Oasis MAX (*mixed-mode anionic exchange*) y Oasis MCX (*mixed-mode cationic exchange*) respectivamente. Unos años más tarde fueron sintetizados los correspondientes polímeros con intercambiadores débiles tanto aniónicos como catiónicos (piperazina y grupo carboxílico respectivamente) y que se pueden encontrar bajo los nombres de Oasis WAX (*weak-anionic exchange*) y Oasis WCX (*weak-cationic exchange*).

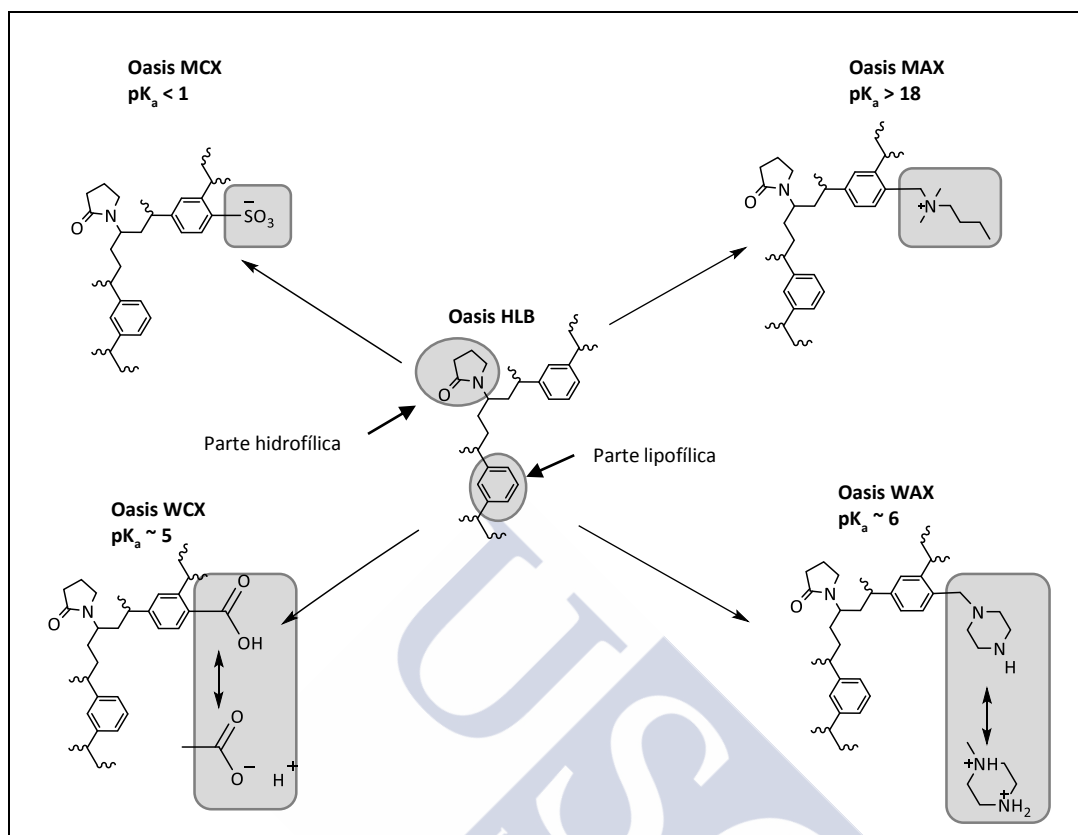


Figura II.13. Estructura de la fase Oasis HLB y los polímeros de modo mixto creados a partir de él 253 .

En la figura II.13 se muestran las estructuras de los cartuchos Oasis HLB así como sus correspondientes modificaciones que han dado lugar a los polímeros de modo mixto. Cuando se emplean fases poliméricas tipo MAX o MCX, los analitos con propiedades ácido-base pueden ver modificado su factor de retención en función del pH como se puede observar en la figura II.14. Esta característica permite separar las interferencias o fraccionar los analitos en según su acidez modificando el pH durante las etapas de limpieza/elución. De esta forma se consiguen métodos más sensibles y selectivos. Estas propiedades han sido aprovechadas para el fraccionamiento de familias de drogas de abuso en muestras acuosas [86, 254], antidepresivos y benzodiacepinas en muestras biológicas [255], como se describe en el apartado de aplicaciones de SPE.

- **Adsorbentes de acceso restringido (*restricted access materials, RAM*):** En este tipo de materiales sólo las partículas de un determinado tamaño pueden ser retenidas por el adsorbente, mientras que las de mayor tamaño serán eluidas al paso de la muestra. Los adsorbentes de acceso restringido son útiles en el caso de eliminar proteínas y

moléculas grandes en muestras biológicas y para la eliminación de ácidos húmicos en muestras ambientales.

- **Adsorbentes de afinidad o inmunoadsorbentes:** Este tipo de adsorbentes se basan principalmente en la retención específica antígeno-anticuerpo o enzima-sustrato en la que la enzima o el anticuerpo se encuentran inmovilizados sobre una base silíceo. Son adsorbentes muy específicos con los que se consiguen extractos muy limpios aunque su elevado coste, la baja estabilidad del adsorbente y la baja reproducibilidad entre lotes unido a la poca disponibilidad comercial limitan su uso.

- **Adsorbentes de impronta molecular (*molecular imprinted polymers, MIPs*):** Su mecanismo es muy similar a los adsorbentes de afinidad pero en este caso se utiliza una molécula muy similar al analito como plantilla para sintetizar un polímero altamente específico para los compuestos que queremos determinar. Cuando se emplea este tipo de adsorbentes se suele hablar de MISPE (*molecularly imprinted solid-phase extraction*). Su estabilidad es más elevada que en el caso de los adsorbentes de afinidad, existe una mayor disponibilidad y su coste es menor [256]. Al ser altamente selectivos permiten obtener unos extractos muy limpios y límites de detección muy bajos. Como contrapartida está que sólo suelen ser eficaces para la retención selectiva de analitos muy similares al empleado como plantilla.

- **Materiales monolíticos o fases continuas:** Los materiales monolíticos se desarrollaron inicialmente como rellenos para columnas cromatográficas y más tarde se aplicaron a SPE [257, 258]. Estos materiales se caracterizan por su polimerización sobre un molde rígido. Los materiales monolíticos se están introduciendo en dispositivos tipo SPE-on-Chip y Lab-on-valve para llevar a cabo una SPE online ya que no generan apenas resistencia al paso de muestra. Entre sus principales problemas se encuentra el elevado volumen muerto debido a los canales que conforman la fase y la lenta transferencia de masa por lo que hasta el momento no se han empleado de forma muy extensa en SPE [240, 251, 259].

- **Nanotubos de carbono:** Se trata de un material muy prometedor en cuanto a sus propiedades ya que posee una alta capacidad, sin embargo son inestables a pH bajos y todavía no se han aplicado de forma extensiva en el campo de la SPE [240, 260].

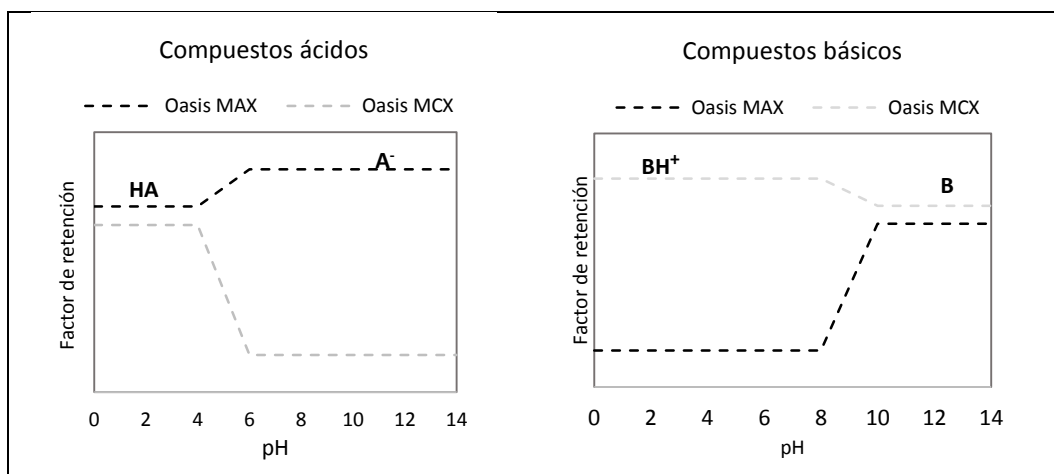


Figura II.14. Retención de los analitos según el pH empleado y el tipo de fase polimérica.

4.2.3 DISPOSITIVOS COMERCIALES

El dispositivo comercial más extendido para la aplicación de SPE en muestras medioambientales son los cartuchos debido en parte a su versatilidad y al gran número de fases adsorbentes disponibles. En este caso el material adsorbente se encuentra empaquetado entre dos fritas de PTFE, acero o teflón formando parte de una jeringa de plástico, vidrio o una columna de acero (este último se emplea principalmente cuando se quiere realizar una SPE *online*). Estos dispositivos poseen terminales estándar que permiten acoplarlos fácilmente a los diferentes dispositivos existentes en el laboratorio. La cantidad de adsorbente que se emplea habitualmente en las aplicaciones analíticas oscila entre 20 y 500 mg, si bien pueden emplearse cartuchos con menor o mayor cantidad de fase (desde 2 mg hasta 70 g) [253]. Aparte de los adsorbentes ya empaquetados se puede comprar el adsorbente a granel y empaquetarlo según las necesidades, aunque suelen ser aplicaciones muy puntuales debido a lo laborioso e irreproducible del proceso. Además de los cartuchos existen otros formatos para realizar la SPE como son los discos, puntas de pipeta, o platos de 96 pocillos como se muestra en la figura II.15.

Los discos se emplean cuando se requiere trabajar a flujos muy altos (p.ej. con grandes volúmenes de muestra) ya que generan poca resistencia al paso de muestra, mientras que los restantes se utilizan habitualmente en análisis que requieren poca

cantidad de muestra como puede ser en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas o en la industria biotecnológica ya que la poca cantidad de fase de la que disponen permite la elución con volúmenes muy bajos (100-500 μL). De esta forma, se consiguen extracciones muy rápidas y en las que no es necesario concentrar el extracto [247, 248, 261, 262].

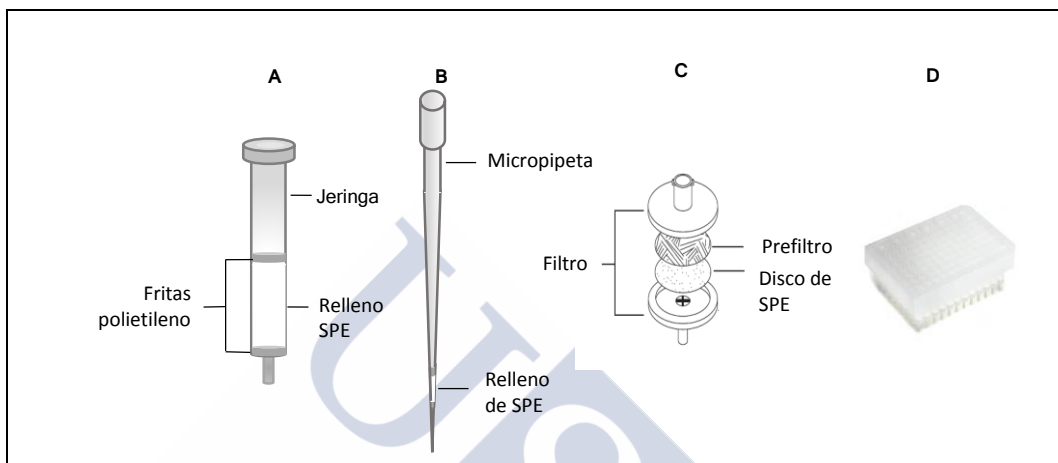


Figura II.15. Diferentes dispositivos empleados para llevar a cabo la SPE. A: cartucho, B: punta de micropipeta, C: disco y D: plato de 96 pocillos.

4.2.4 VENTAJAS E INCONVENIENTES

Si se compara la SPE con la LLE las ventajas son sustanciales: reducido consumo de disolventes, concentración y limpieza en un solo paso, se evita la formación de emulsiones y se puede aplicar a un número muy elevado de analitos y matrices. Además se puede automatizar y la eficacia de extracción y factores de concentración son elevados. Como inconvenientes, destacar la laboriosidad del proceso si no se dispone de un robot de automatización, el elevado precio de los cartuchos y el alto volumen de disolvente empleado comparado con las técnicas de microextracción.

4.2.5 APLICACIÓN DE LA SPE EN LA DETERMINACIÓN DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS EN ESTA TESIS.

A continuación se recogen las aplicaciones más relevantes para la extracción de los analitos estudiados en esta Tesis empleando SPE como técnica de extracción y clasificados por familias (ver tabla II.15-17).

4.2.5.A Cannabinoides y estimulantes de tipo anfetamínico

Las drogas de abuso han sido extraídas y preconcentradas tradicionalmente por SPE durante los últimos diez años debido a las ventajas que ofrece esta técnica. Los cannabinoides y ATS se analizan conjuntamente con analitos derivados de los opiáceos (heroína, morfina y sus metabolitos) y alcaloides (cocaína, escopolamina y metabolitos). El tipo de material más empleado para su análisis ha sido el relleno polimérico con balance hidrofílico-lipofílico tipo Oasis HLB y de intercambio catiónico fuerte tipo Oasis MCX o Strata XC (comercializados por Phenomenex), ver tabla II.15. Los volúmenes de muestra empleados oscilan entre 100 y 500 mL dependiendo de la complejidad de la matriz y del grado de preconcentración que se requiera, empleando cantidades de fase en torno a 150-200 mg (dependiendo del tipo de cartucho). Por otra parte, las aplicaciones que proponen volúmenes de muestra menores (50 mL) también reducen la cantidad de fase empleada (25-60 mg).

Cuando se emplean cartuchos Oasis HLB es habitual trabajar sin modificar el pH de las muestras (habitualmente entre 6-7) e incluir una etapa de lavado una vez cargada la muestra, con agua ultrapura o con un pequeño porcentaje de MeOH para eliminar las interferencias débilmente retenidas. La elución se suele realizar con 3-8 mL de MeOH o acetato de etilo (AcOEt) dependiendo del equipo de medida. Por otra parte los métodos que emplean cartuchos de intercambio catiónico fuerte (tipo Oasis MCX o Strata-XC) acostumbran a trabajar con muestras acidificadas (pH 2-5) para mejorar la retención de los analitos básicos. Al igual que cuando se emplean fases poliméricas tipo Oasis HLB es habitual realizar un lavado con agua ultrapura neutra o acidificada o con un cierto porcentaje de MeOH. La elución se lleva a cabo con 2-6 mL MeOH y una cantidad de hidróxido amónico (NH₄OH) que oscila entre 0.5 y 5 %. De esta forma se consigue romper las interacciones entre el analito y el grupo intercambiador de cationes y conseguir así la elución de los compuestos retenidos tanto por intercambio iónico como por fase reversa.

Recientemente, González-Mariño et al. [86] propusieron una elución fraccionada aprovechando la diferente retención que se produce en los cartuchos de modo mixto (Oasis MCX) para poder separar los compuestos ácidos y neutros de los compuestos básicos.

Tabla II.15. Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para la determinación de cannabinoides y ATS en matrices acuosas empleando SPE.

Análitos ^a	Volumen/ mL	Cartucho	pH	Lavado	Elución	Determinación (analizador)	% Recup.	LOQ ng L ⁻¹	Ref
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA,	100-500	Oasis HLB (200 mg)	Ajuste a pH 8.5	--	2 mL AcOEt, 8 mL de Acetona	GC-MS/MS (IT)	67-137	3-40 ^b	[99]
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	50	Supel MIP- Amphetamine (25 mg)	Ajuste a pH ~8	2 x 1 mL H ₂ O (pH 8), 1 mL ACN/H ₂ O , 1 mL ACN (CH ₃ COOH)	2 x 1 mL MeOH/HCOOH	HPLC-MS/MS (QqQ)	92-114	2-8 ^b	[187]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA,	200-500	Oasis MCX (150 mg)	Ajuste a pH 4.5	10 mL H ₂ O (pH 4.5)	2 mL MeOH (cann), 4 mL MeOH/NH ₄ OH (ATS)	HPLC-MS/MS (QTOF)	90-124	4-50	[86]
THC, THCCOOH	200	Oasis HLB (200 mg)	--	3 mL H ₂ O	8 mL MeOH	U(H)PLC-MS/ MS (QqQ)	42-96	7-12	[30]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDMA	5	Oasis HLB (cann) (10 x 2 mm) PS-DVB (ATS) (10 x 2 mm)	--	1 mL H ₂ O	Gradiente ACN/H ₂ O	HPLC-MS/MS (QqLIT)	--	0.3-11	[95]
AMP, MAMP, MDMA, MDEA	200	Strata-XC (500 mg)	Ajuste a pH 2	10 mL H ₂ O (pH 2), 10 mL H ₂ O (HCOOH), 10 mL H ₂ O (MeOH)	10 mL MeOH/NH ₄ OH	HPLC-MS/MS (QqQ)	55-85	0.2-1.5 ^b	[92]
THC, THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA,	50	Xtrata-XC (200 mg)	Ajuste a pH 2.5	3 mL H ₂ O (pH 2.5)	3 x 2 mL MeOH/NH ₄ OH	HPLC-MS/MS (QqQ)	22-107	0.3-60	[96]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	50	Oasis MCX (60 mg)	Ajuste a pH 2	--	3 mL MeOH, 3 mL MeOH/NH ₄ OH	HPLC-MS/MS (QqQ)	51-112	1-9	[29]

Tabla II.15. (cont.)

Analitos ^a	Volumen/ mL	Cartucho	pH	Lavado ^b	Elución	Determinación (analizador)	% Recup.	LOQ ng L ⁻¹	Ref
THCCOOH, AMP, MAMP, MDMA	125-250	Oasis MCX (150 mg)	Ajuste a pH 2	--	6 mL H ₂ O (cann), 6 mL MeOH/NH ₄ OH	HPLC-MS/MS (QqQ)	64-76	0.2-2.5	[254]
AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA,	100	Oasis HLB (200 mg)	--	8 mL H ₂ O/MeOH	6 mL MeOH	U(H)PLC-MS/MS (QqQ)	70-101	0.4-2	[102]
AMP, MAMP, MDA, MDMA	100-200	Oasis MCX (150 mg)	Ajuste a pH 3	3 mL H ₂ O/MeOH	2 x 3 mL MeOH/NH ₄ OH, 5 mL MeOH/NH ₄ OH	HPLC-MS/MS (QqLIT)	--	3-22	[94]
AMP, MAMP, MDMA	50	Oasis MCX (60 mg)	Ajuste a pH 2	3 mL H ₂ O	4 mL MeOH, 4 mL MeOH/NH ₄ OH	HPLC-MS/MS (QqQ)	99-102	1-2	[186]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	250-500	Oasis HLB (500 mg)	--	2 x 5 mL H ₂ O	2 x 5 mL MeOH	HPLC-MS/MS (QqQ)	61-113	5-20	[97]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	50	Oasis MCX (150 mg)	Ajuste a pH 2	5 mL H ₂ O /NH ₄ OH	8 mL MeOH/NH ₄ OH	U(H)PLC-MS/MS (QqQ)	48-120	1.7- 8300 ^b	[85]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDMA	250	Strata X (500 mg)	--	6 mL H ₂ O	6 mL MeOH	U(H)PLC-MS/MS (QqQ)	65-100	1	[100]
THCCOOH, AMP, MAMP, MDA, MDMA, MDEA	1	Oasis HLB (20 x 2.1 mm)	Ajuste a pH 3	--	Gradiente H ₂ O/MeOH	HPLC-MS/MS (QqQ)	--	1-250	[111]

^a Solo se recogen los analitos estudiados en esta Tesis. ^b LOQ estimado a partir del valor de LOD. ACN: acetonitrilo

Para ello eluían THC y THCCOOH con 2 mL de MeOH y a continuación empleaban 4 mL de MeOH/NH₄OH (95:5) para liberar los compuestos retenidos por cambio catiónico (ATS y demás compuestos básicos). Los extractos eran concentrados de forma independiente y ambas fracciones se inyectaban con métodos diferentes para conseguir una mayor sensibilidad y selectividad, especialmente en el caso de los cannabinoides. La misma metodología fue aplicada más tarde por Senta et al. [254] añadiendo una etapa posterior de limpieza con cartuchos Strata NH₂ a la fracción que contenía los cannabinoides. De esta forma conseguían LOQs inferiores a 2 ng L⁻¹, 50 veces menor que cuando aplicaban la elución conjunta de todos los analitos usando cartuchos Oasis HLB [89].

Los únicos adsorbentes comerciales MIPs para la extracción de drogas han sido comercializados por Supelco bajo el nombre de SupelMIP-Amphetamine y hasta la fecha la única aplicación ha sido la propuesta por González-Mariño et al. [187] en la que comparaba la extracción de cinco ATS (AMP, MAMP, MDA, MDMA y MDEA) en muestras acuosas usando este adsorbente y comparándolo con los cartuchos Oasis HLB y MCX. El uso de MISPE dio como resultado unos extractos más limpios, con menor supresión de la señal, mejores recuperaciones (91-114 %) y mejores límites de detección (0.5-2.7 ng L⁻¹) que en el caso de los adsorbentes poliméricos con lo que se confirma su idoneidad para la extracción de ATS en muestras acuosas de diferente complejidad.

En los últimos años se han desarrollado métodos de SPE *online* para la extracción de cannabinoides y ATS. Estos métodos se caracterizan por emplear un bajo volumen de muestra (1-5 mL), con una mínima manipulación de muestra y muy poco volumen de disolvente para la elución, además se prescinde de la etapa de evaporación con lo que se minimiza la pérdida de analitos por volatilización. Si bien sus ventajas son muchas, su implantación es más lenta que la de los métodos *offline* debido a su mayor complejidad e instrumentación necesaria. Uno de los métodos más prometedores ha sido el propuesto por Postigo et al. [95] en el que empleaban 5 mL de muestra y columnas de SPE de diferente naturaleza para realizar una determinación selectiva de cannabinoides y ATS (Oasis HLB y PS-DVB). El sistema permitía realizar un cambio de columna de SPE de forma completamente automática y determinar los analitos en un LC-QqLIT empleando modos de ionización diferentes según la naturaleza de los analitos (modo negativo para

cannabinoides y positivo para el resto) lo que permitía obtener un LOQ para los cannabinoides muy bajo ($1.5\text{-}4\text{ ng L}^{-1}$) algo que no consiguieron Östman et al. [111] empleando 1 mL de muestra y adsorbente HLB para la determinación conjunta de THCCOOH y ATS (LOQ para THCCOOH: 250 ng L^{-1} , LOQ para ATS: $1\text{-}50\text{ ng L}^{-1}$). Ya en 2015 Heuett et al. [189] acoplaron la SPE *online* a un detector de alta resolución (Orbitrap) trabajando en modo MS y obtuvieron LOQs similares a los publicados previamente por Postigo et al [95] empleando baja resolución.

4.2.5.B Benzodiazepinas, zolpidem y metilfenidato

La extracción de BZPs de muestras medioambientales no ha sido un campo muy estudiado hasta el momento, si bien su determinación en muestras biológicas es bastante habitual con el análisis simultáneo de entre 10-30 analitos. En su extracción de estas matrices se han empleado diferentes tipos de materiales adsorbentes como sílices enlazadas, cartuchos poliméricos de modo mixto, balance hidrofílico-lipofílico o MIPs [208, 263-265].

En muestras medioambientales se analizan un número de BZPs y compuestos relacionados bastante reducido (2-7) que incluyen principalmente DIA, ALP, LOR, OXA y TEM. Estos compuestos suelen englobarse dentro de métodos multianalito que analizan conjuntamente fármacos, drogas de abuso o disruptores endocrinos entre otros, con lo que los parámetros óptimos para su extracción suelen quedar relegados a los óptimos para todo el conjunto de analitos. En la tabla II.16 se recogen los métodos más relevantes que emplean SPE para el análisis de un número significativo de BZPs, metabolitos y compuestos relacionados. Los volúmenes de muestra que se emplean oscilan entre 50 y 200 mL en el caso de muestras de aguas residuales, sin embargo en muestras de agua superficial o subterránea en las que se espera encontrar los compuestos en concentraciones muy bajas, es necesario emplear 500-1000 mL [82, 84, 266]. Como se puede observar, la mayoría de las aplicaciones emplean cartuchos tipo Oasis HLB o cartuchos de modo mixto con intercambio catiónico fuerte debido a las propiedades básicas de esta familia de compuestos.

Tabla II.16. Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para la determinación de BZPs y compuestos relacionados en matrices acuosas empleando SPE.

Analitos ^a	Volumen/ mL	Cartucho	pH	Lavado	Elución	Determinación (analizador)	% Recup.	LOQ ng L ⁻¹	Ref
ALP, BROM, CHLOR, DIA, NDIA, FLUN, LOR, MID, NDIA, OXA, TEM	50	Strata XC (200 mg)	Ajuste a pH 2.5	3 mL H ₂ O (pH 2.5)	3 x 2.5 mL MeOH/NH ₄ OH	UPLC-MS/MS (QqQ)	45-103	0.5-44	[96]
DIA, CHLOR, NDIA, OXA, TEM	100-500	Oasis MCX (60 mg)	Ajuste a pH 2	2 mL H ₂ O (pH 2), 2 mL MeOH/HCOOH	3 mL MeOH/NH ₄ OH	UPLC-MS/MS (QqQ)	48-205	0.5-21	[82]
ALP, BROM, CLHOR, DIA, LOR, OXA, ZOLP	100	Oasis HLB (200 mg)	--	8 mL H ₂ O	2 x 3 mL MeOH	UPLC-MS/MS (QqQ)	71-110	0.02-15	[114]
DIA, MPHEN, NDIA, OXA, TEM	100-200	Oasis HLB (150 mg)	--	8 mL H ₂ O	8 mL MeOH	HPLC-MS/MS (Orbitrap)	45-109	2-20	[188]
BROM, DIA, NDIA, OXA, TEM,	100-1000	Oasis HLB (200 mg)	--	--	4 x 2mL Acetona	HPLC-MS/MS (QqQ)	56-162	1-20	[84]
DIA, BROM, LOR	100	Oasis HLB (200 mg)	Ajuste a pH 3	--	15 mL MeOH	HPLC-MS/MS (QqIT)	84-110	2-5	[112]
ALP, DIA, LOR	25-500	Oasis HLB (60-200 mg)	--	5 mL H ₂ O	6 mL MeOH	UPLC-MS/MS (QqLIT)	50-122	0.2-43	[266]
ALP, CLON, OXA, ZOLP	100	Oasis HLB (200 mg)	Ajuste a pH 3	H ₂ O/MeOH	5 mL MeOH, 3 mL AcOEt	HPLC-MS/MS (QqQ)	67-126	0.4-13	[211]
ALP, BROM, DIA, LOR, ZOLP	50 -100	Oasis MAX (500 mg)	Ajuste a pH 2	---	2 x 3 mL MeOH	HPLC-MS/MS (QqLIT)	37-145	2-7	[212]
ALP, FLUN, MID, MPHEN, OXA, ZOLP	1	Oasis HLB (20 x 2.1 mm)	Ajuste a pH3	--	Gradiente MQ/MeOH	HPLC-MS/MS (QqQ)	--	1-10	[111]

^a Sólo se recogen los analitos estudiados en esta Tesis.

Los analitos son eluidos con MeOH (excepto en el caso de materiales poliméricos tipo Oasis MCX o Strata-XC que se hace con MeOH/NH₄OH). Su detección en muestras medioambientales tiene lugar mediante LC-MS/MS con LOQs inferiores a 20 ng L⁻¹ en la mayoría de los casos.

El empleo de SPE *online* se publicó en 2011 por Postigo et al. [267] para el ALP como una modificación de un método previamente descrito para la extracción de drogas de abuso [95] en el que empleaba polímeros macroporosos de PS-DVB para preconcentrar analitos neutros y básicos usando 5 mL de muestra. Posteriormente este método fue aplicado por Valcárcel et al. [83] (con ligeras modificaciones y ampliado a más compuestos) a aguas superficiales y de bebida en España. También Repice et al. [210] emplearon el mismo volumen de muestra y adsorbentes Pursuit C18 (20 x 2.0 mm, 10 µm) para realizar un método *online* acoplado a LC-MS/MS. Entre otros analitos determinaban DIA, LOR y LORM en aguas superficiales y residuales y los LOQs obtenidos oscilaron entre 17-50 ng L⁻¹. Por otra parte Östman et al. [111] mejoraron los LOQs obtenidos hasta el momento cuando emplearon Oasis HLB (20 x 2.1 mm, 15 µm) y solamente 1 mL de muestra (LOQs para las seis BZPs estudiadas entre 1 y 10 ng L⁻¹).

4.2.5.C Antiinflamatorios no esteroideos

La SPE es la técnica más empleada para la extracción de NSAIDs en muestras acuosas. En la tabla II.17 se recogen algunos de los métodos más representativos que emplean SPE-CG-MS.

Como norma general las muestras se acidifican a pH 2-3 para mejorar la retención de los analitos cuando se emplean cartuchos de fase reversa excepto en aplicaciones puntuales que se trabajó a pH neutro [229, 268]. Los adsorbentes más usados son los cartuchos poliméricos tipo Oasis HLB [269-271] o Strata-X (relleno polimérico de PS-DVB modificado con grupos pirrolidona para incrementar la polaridad) [127, 272].

Sin embargo, cuando los NSAIDs son analizados junto con otros compuestos de naturaleza básica o neutra (métodos multianalito) puede ser más adecuado usar otro tipo de cartuchos como pueden ser los Oasis MCX [133, 273] o Oasis MAX [212] y llegar a un compromiso en la retención de todos los analitos.

Tabla II.17. Resumen de los métodos de determinación empleados en la bibliografía para la extracción de NSAIDs en matrices acuosas y determinación mediante SPE-GC-MS.

Analitos ^a	Volumen /L	cartucho	pH	Lavado	Elución	Derivatizante (catalizador)	Analizador (modo trabajo)	% Recup.	LOQ ng L ⁻¹	Ref
IBU, NAP, KET, DIC	0.5	Oasis HLB (60 mg)	Ajuste a pH 2-2.5	--	2 mL AcOEt	MTBSTFA	IT (scan)	88-118	10-50	[123]
IBU, NAP, DIC	1-2	Oasis HLB (60 mg)	Ajuste a pH 2-3	--	6 mL AcOEt/Acetona	MTBSTFA (1 % TBDMSC)	Q (SIM)	66-116	3-12	[220]
IBU, NAP, KET, DIC	1	Oasis HLB (60 mg)	Ajuste a pH 3	1 mL MeOH/H ₂ O	6 mL AcOEt/Acetona	Diazometano	Q (SIM)	65-102	1-15	[128]
IBU, NAP, KET, DIC	0.5-1	Oasis MCX (60 mg)	Ajuste a pH 2	--	3 mL AcOEt 3mL AcOEt/Acetona 3 mL AcOEt	MSTFA	Q (SIM)	80-106	0.3-39	[133]
IBU, NAP, KET, DIC	1	Oasis HLB (60 mg)	Ajuste a pH 7	2 mL Hexano	2 x 1.5 mL AcOEt	BSTFA	Q (SIM)	80-108	30-150 ^c	[229]
IBU, DIC	0.1	Oasis HLB (200 mg)	Ajuste a pH 7	5 mL H ₂ O	4 x 2 mL AcOEt	--	IT ^b (scan)	79-80	4-400	[268]
IBU, NAP, KET, DIC	0.5-1	Oasis HLB (60 mg)	Ajuste pH 2	MeOH/H ₂ O	9 mL AcOEt/Acetona	MSTFA	Q (SIM)	78-91	0.4-0.9	[274]
IBU, NAP, KET, DIC	1	Strata X (60 mg)	Ajuste a pH 2.6	--	3 x 0.5 mL MeOH	MSTFA	Q (scan)	84-157	7-20	[127]
IBU, NAP, KET, DIC	1	RP-C18 (1 g)	Ajuste a pH 3	--	4 mL Acetona	PFBBr (TEA)	Q (SIM)	67-105	40-100	[234]

^a Sólo se recogen los analitos estudiados en estas Tesis. ^b cuantificación empleando el modo MS/MS. ^c LOQ estimado a partir del LOD. TBDMSC: *tert*-butildimetilcorosilano, TEA: trietilamina.

En menor medida han sido usados rellenos de sílice enlazada como son los cartuchos de fase reversa C18 [234]. El empleo de cartuchos MIP comerciales fue evaluado por Zorita et al [129] en muestra de influente, efluente y agua de bebida. La extracción producía unos extractos muy limpios y sin efecto de matriz, ni supresión de la señal en LC-ESI-MS/MS lo que permitía obtener unos LOQs inferiores a 10 ng L^{-1} . También Gilart et al. [275] compararon cartuchos MIP (Affinilute MIP-NSAIDs, 150 mg) con Oasis HLB, MAX y MCX. Las recuperaciones obtenidas con MISPE fueron ligeramente inferiores a las obtenidas con los otros cartuchos (entre 63-85 % para IBU, NAP y DIC) sin embargo permitían un fraccionamiento eficaz de los compuestos básicos y neutros con una reducción significativa de los efectos de matriz y menor supresión de la señal obteniendo LOQs muy similares a los publicados anteriormente por Zorita et al. (entre 1.5 y 7 ng L^{-1}).

4.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN NO EXHAUSTIVAS EMPLEANDO AB/ADSORBENTES

La preocupación por el medioambiente, la generación de residuos, los daños que estos producen y su dificultad para eliminarlos ha crecido en los últimos años. Como consecuencia de ello ha surgido la “Química Verde” o “Química Sostenible” que se puede resumir como una filosofía dirigida hacia minimizar el uso de reactivos tóxicos y/o peligrosos para el medio ambiente y prevenir la formación de residuos difíciles de reciclar, minimizando la contaminación desde su origen a cualquier escala. Esta percepción ha llegado también a la Química Analítica donde se trata de potenciar el desarrollo de métodos que sean cada vez más seguros, más eficientes económicamente y compatibles con un desarrollo sostenible [276].

Por este motivo las técnicas analíticas de microextracción ganan cada vez más aceptación ya que tienden a una disminución en el consumo de disolventes orgánicos y a una menor generación de residuos. Estas técnicas son consideradas como no exhaustivas ya que el objetivo final no es conseguir extraer la totalidad de analito presente en la muestra, sino llegar al equilibrio entre la cantidad de analito presente en la fase extractante y la muestra, haciendo esto de manera reproducible. Las técnicas de extracción no exhaustivas tienen dos etapas bien diferenciadas como se puede ver en la figura II.16.

- **Etapa cinética o de no equilibrio:** Esta etapa es la que determina la velocidad a la que se alcanza la máxima respuesta. En procesos muy lentos se suele trabajar en esta zona sacrificando la zona de máxima sensibilidad (etapa termodinámica o de equilibrio) que tardaría mucho tiempo en ser alcanzada. Entre los factores que afectan a la cinética están la difusión de los analitos desde la matriz hacia el material extractante, la agitación y la superficie y geometría de la fase extractante. Si bien la difusión de los analitos está regida por la constante de difusión y las características del medio, los otros dos factores (agitación y superficie de la fase extractante) pueden ser modificados de forma que ayuden a los analitos a alcanzar la interfase con mayor rapidez [277].

- **Etapa termodinámica o de equilibrio:** Esta etapa está regida por las constantes de distribución que son a su vez, las que establecen el máximo de analito que puede ser extraído en unas determinadas condiciones. Todos los factores que influyen en dicha constante (temperatura, fuerza iónica, pH...) pueden modificarse para maximizar la cantidad de analito que puede ser extraída en el equilibrio. También se pueden llevar a cabo reacciones que modifiquen alguna propiedad del analito de forma que se incremente su afinidad por la fase extractante [277].

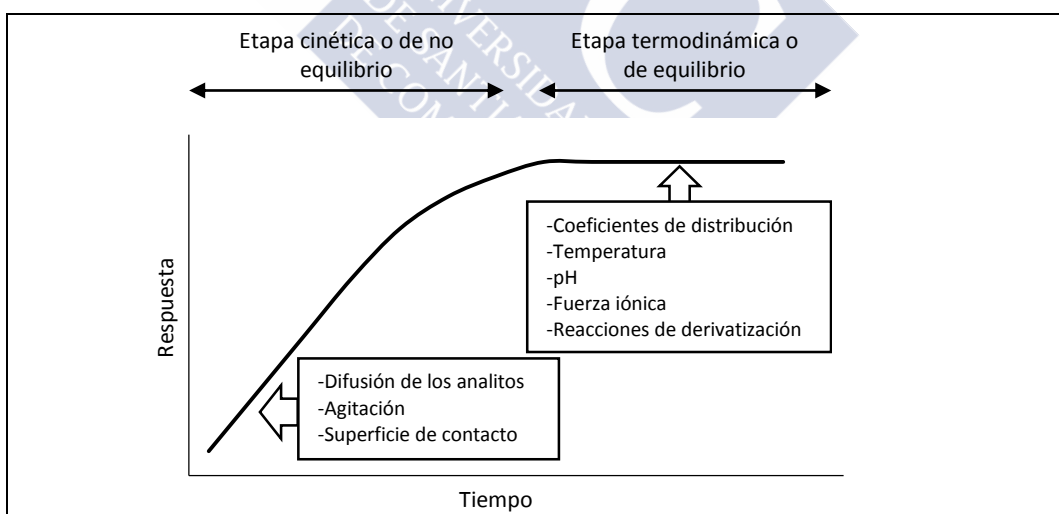


Figura II.16. Etapas en las técnicas de extracción no exhaustivas y los principales factores que influyen en cada una de ellas. Modificado de Cruz-vera et al. [278] con permiso de Elsevier.

A continuación se describen algunas de las variantes más relevantes de las técnicas de extracción no exhaustivas con ad/absorbentes sólidos, centrándose en las que

se han empleado en esta Tesis (SPME, extracción con polímeros ab/adsorbentes de bajo coste y FPSE).

4.3.1 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction, SPME*) fue desarrollada por Pawliszyn et al. en 1989 [279] y se basa en la ab/adsorción de los analitos sobre un polímero que se encuentra anclado a una fibra de sílice y ésta a su vez, sobre un soporte metálico. El uso de SPME permite realizar extracciones sin la utilización de disolventes orgánicos y con poca cantidad de muestra (menos de 100 µL) lo que supone un gran avance respecto a las técnicas que se habían estado usando hasta el momento [280, 281]. Las bajas eficacias de extracción (en torno al 2-50 %) que en un primer momento podrían ser consideradas como un inconveniente de la técnica, se compensan con la introducción del 100 % del analito extraído en el equipo de determinación frente a otras técnicas de extracción exhaustivas (p. ej. SPE) en las que la fracción de analito que se inyecta en el equipo no supera el 1-5 % de toda la cantidad extraída. Por ello la SPME permite obtener excelentes LOQs aunque la eficacia de extracción sea baja.

4.3.1.A Dispositivo comercial y modo in-tube

El dispositivo comercial ha sido desarrollado y comercializado por la compañía Supelco y consta de una jeringa o cuerpo metálico en el que se acoplan las diferentes fibras como puede observarse en la figura II.17. El émbolo permite exponer la fibra en mayor o menor medida y retraerla cuando no se está usando o durante su transporte, (evitando su rotura y degradación) al desplazarse por la ranura en forma de Z dispuesta a lo largo del cuerpo metálico. Además, la presencia de una ventana en la parte final del dispositivo permite saber qué tipo de fibra está colocada. Este dispositivo es compatible tanto con GC como con LC.

Aparte de la extracción usando fibras comerciales también se puede usar un fragmento de una columna capilar de GC o micro-LC, lo que se ha denominado SPME *in-tube* [280, 282]. La SPME *in-tube* se aplica combinada *online* con la LC colocándose entre el automuestreador y el bucle de inyección, como se puede observar en la figura II.18.

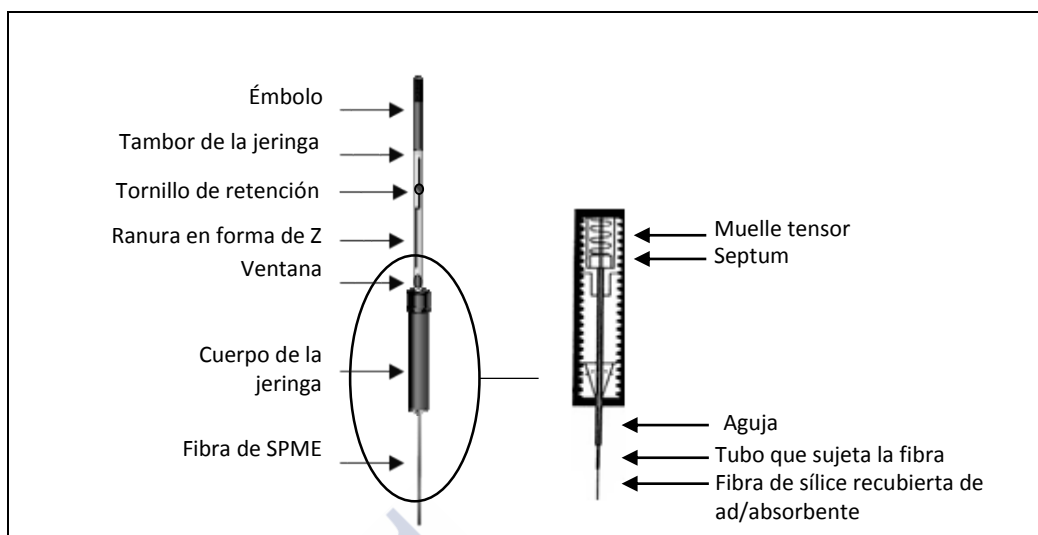


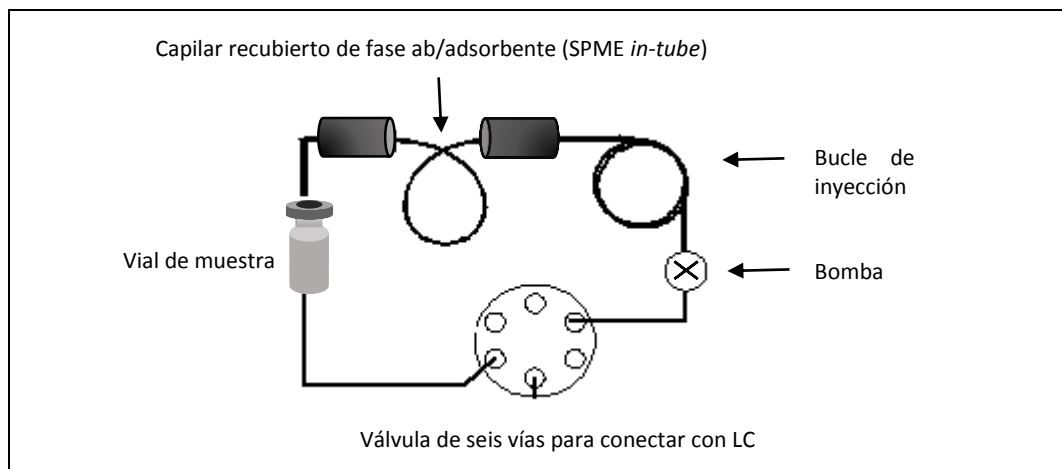
Figura II.17. Detalle del montaje de la fibra de SPME: detalle del interior y partes diferenciadas de la aguja.

En SPME *in-tube*, la muestra es bombeada durante varios ciclos a través de la columna capilar hasta que se alcanza el grado de concentración deseado o el equilibrio y a continuación se desorbe usando la fase móvil empleada en la separación. De esta forma es posible extraer y concentrar los analitos *online* de una forma fácil, robusta y completamente automatizada, presentándose como una alternativa al acoplamiento fibra SPME-LC y los problemas derivados de esta unión [283, 284].

Como principal inconveniente de este modo de trabajo destacar que sólo se puede emplear en muestras muy limpias ya que los sucesivos ciclos de carga-descarga pueden generar obstrucciones en el capilar.

4.3.1.B Modo de trabajo

Cuando se usa una fibra nueva (o lleva mucho tiempo sin usarse) se requiere realizar un acondicionamiento durante un tiempo especificado por el fabricante (generalmente 0.5-2 h) y a una temperatura dada (entre 220 y 320 °C) para limpiarla de posibles impurezas y usarla en condiciones óptimas. En la tabla II.18 se recogen las principales fibras comerciales, así como su acondicionamiento y parámetros óptimos de funcionamiento (pH y temperatura máxima) en el que se puede trabajar sin dañar el material.

Figura II.18. Esquema del acoplamiento SPME *in-tube* a un LC.Tabla II.18. Tipos de recubrimientos para fibras de SPME para fibras disponibles en la actualidad y principales recomendaciones de uso según el fabricante. ^a Para la fibra de PDMS de 7 μm .

Recubrimiento	Abreviatura	T ^a máxima de desorción (°C)	pH	T ^a acond. (°C)	Tiempo acond.(h)
Polidimetilsiloxano	PDMS	280 340 ^a	2-11	250 320	0.5 1 ^a
Polidimetilsiloxano/divinilbenceno	PDMS/DVB	270	2-11	250	0.5
Carboxen/polidimetilsiloxano	CAR/PDMS	320	2-11	300	1-2
Divinilbenceno/carboxen/ polidimetilsiloxano	DVB/CAR/PDMS	270	2-11	270	1
Poliacrilato	PA	320	2-11	300	2
Carbowax-Polietilenglicol	PEG	250	2-9	240	0.5

La SPME al igual que las demás técnicas de extracción basadas en la ab/adsorción sobre un soporte sólido consta de dos etapas; la extracción y la desorción. A continuación se describe cada una de ellas:

- **Extracción o muestreo:** En esta primera etapa se produce la ab/adsorción de los analitos en la fibra. Para ello es necesario que la muestra (generalmente líquida) se deposite en un vial, que posteriormente se cierra con un septum de goma. A continuación, el septum es perforado para poder insertar a través de él la aguja de la jeringa de SPME. Una vez que la jeringa de SPME está sujeta en su posición, el émbolo desciende para que la fibra pueda ser expuesta a la muestra durante el tiempo requerido para el análisis. Según el contacto que se realice entre la fibra y la muestra existen diferentes tipos de

muestreo y que se muestran de forma gráfica en la figura II.19. La selección de uno u otro dependerá de la volatilidad de los analitos, de su afinidad por la matriz y de la naturaleza de la muestra.

Directo (DI-SPME) (A): La fibra se encuentra completamente sumergida en la muestra. Este tipo de muestreo suele utilizarse en muestras poco complejas y con analitos poco volátiles ya que es más fácil que se dañe la fibra y disminuya su tiempo de vida.

Espacio de cabeza (Head space, HS-SPME) (B): En este caso la fibra se sitúa en el espacio gaseoso que hay sobre la muestra. De esta forma se consigue una menor extracción de interferencias y además se pueden usar condiciones más agresivas de pH y redox puesto que la fibra no está en contacto directo con la muestra. Este tipo de muestreo es muy común cuando hay que realizar reacciones de derivatización o con analitos volátiles donde se puede aumentar la temperatura para favorecer su desplazamiento al espacio de cabeza logrando de esta forma una extracción muy selectiva.

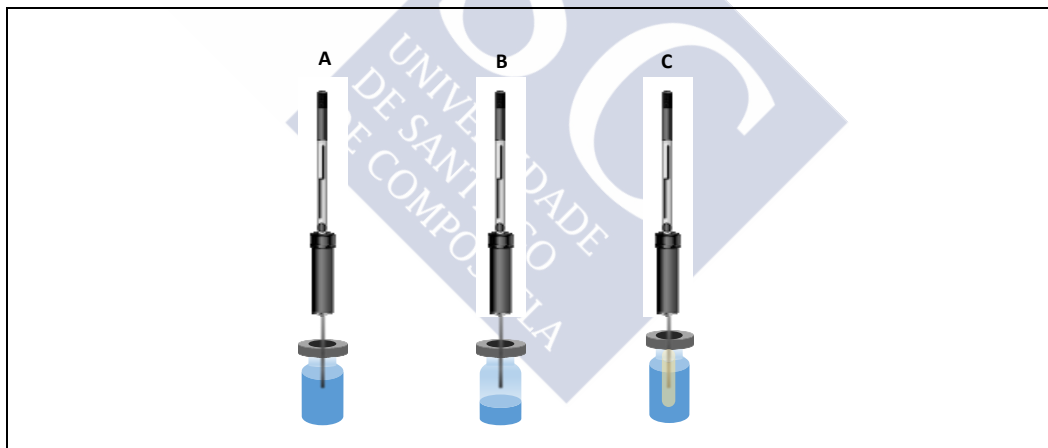


Figura II.19. Diferentes tipos de muestreo en SPME según la posición de la fibra. A: directo, B: espacio de cabeza y C: directo con el uso de membrana protectora.

Con membrana protectora (C): En este caso se usa una membrana de un material poroso (p. ej. polipropileno) para recubrir y proteger la fibra. La presencia de una barrera entre la fibra y la muestra hace que la extracción se ralentice, además la propia membrana puede actuar como un medio extractante en sí mismo disminuyendo la cantidad de analito que se deposita sobre la fibra. En este tipo de muestreo aumenta el número de equilibrios presentes y el sistema se transforma en un medio complejo de analizar desde

el punto de vista termodinámico. Se suele usar en muestras muy complejas cuando la extracción en espacio de cabeza no es viable y se quiere limitar el acceso de analitos voluminosos o que puedan dañar la fibra, aún así es un modo de extracción que no ha tenido demasiada aceptación.

- **Desorción:** En la segunda etapa los analitos se transfieren desde la fibra hasta la columna cromatográfica para llevar a cabo su determinación. Para ello es necesario retraer la fibra (subiendo el émbolo) y extraerla del vial. Los analitos pueden ser analizados mediante GC o LC siendo el proceso de transferencia de materia diferente según la técnica de determinación, como se recoge a continuación y se muestra gráficamente en la figura II.20.

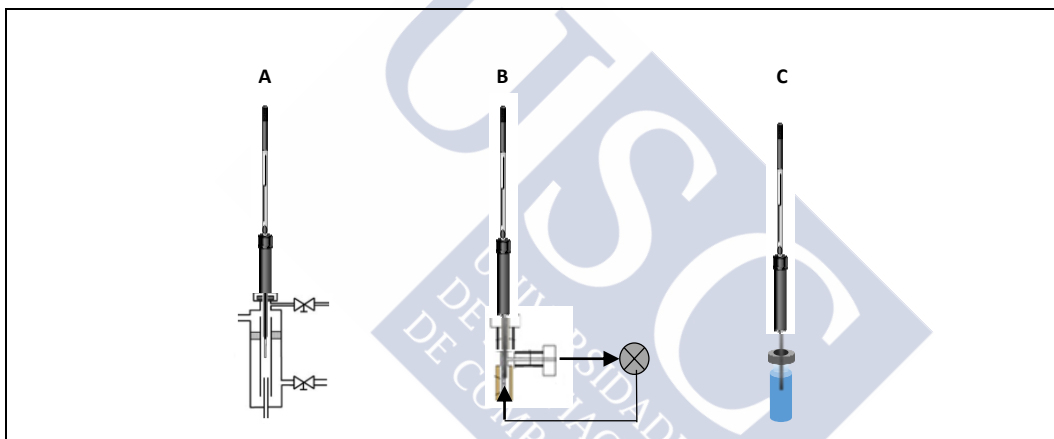


Figura II.20. Diferentes modos de desorción de las fibras de SPME. A: en el inyector de un GC, B: en la interfase de un LC y C: en modo *offline* en un disolvente.

En un cromatógrafo de gases: El dispositivo de SPME es introducido directamente al inyector de cromatógrafo y la fibra es expuesta de nuevo en el *liner*. A continuación, se produce una termodesorción debido a las altas temperaturas (220-300 °C, dependiendo de la estabilidad de la fibra) a las que se encuentra el inyector, que produce una disminución del coeficiente de partición fibra-gas portador a la vez que la presencia del gas portador favorece el arrastre de los analitos hacia la columna cromatográfica. De esta forma se logra una desorción completa en un tiempo próximo a los 5 minutos. Además, todo el proceso de determinación puede automatizarse usando para ello un automuestreador multipropósito como el MPS (Gerstel) o CombiPal (CTC Analytics).

En un cromatógrafo de líquidos: Como ya se mencionó anteriormente el acoplamiento directo SPME-LC no es sencillo ya que se necesita una unidad adicional en la que realizar la desorción de la fibra usando para ello la fase móvil del sistema si se quiere realizar un proceso automático. Además se suelen producir picos anchos debido a la dilución producida durante la desorción o incluso desorciones incompletas [285, 286]. Por ello, también es posible la desorción *offline* en un disolvente, pero en este caso se perdería una de las principales ventajas de la técnica: la inyección de toda la cantidad de analitos extraída y la ausencia de disolventes orgánicos.

4.3.1.C Derivatización

Cuando se analizan compuestos polares mediante GC la derivatización suele tener especial importancia ya que mejora notablemente su extracción y/o determinación. A continuación se describen las posibilidades que ofrece la SPME en la derivatización de los analitos [172, 287, 288].

- **Derivatización *in-situ* (en la muestra):** En este caso el reactivo derivatizante se añade directamente al vial que contiene la muestra y la derivatización tiene lugar previa o simultáneamente al proceso de extracción con lo cual las especies extraídas en la fibra de SPME ya se encuentran derivatizadas. Para realizar este proceso es necesario que el derivatizante sea estable en agua, por lo que los derivatizantes sililantes no se pueden usar y los más empleados para este fin suelen ser reactivos acilantes (p.ej. anhídridos o cloroformatos).
- **Derivatización en la propia fibra:** En este caso la derivatización puede producirse de dos modos distintos:

Simultáneamente a la extracción: En este caso la fibra es dopada previamente con el derivatizante (normalmente mediante contacto directo por inmersión) y a continuación se procede a realizar la extracción en modo HS-SPME de forma que los analitos se van derivatizando a medida que se van depositando sobre la fibra. Para que la reacción se pueda llevar a cabo es necesario que el derivatizante presente una alta afinidad por la fibra para evitar su volatilización durante la etapa de extracción de los compuestos. Este modo no es muy empleado ya que produce una alta degradación química de la fibra.

Posterior a la extracción: En este caso una vez que los analitos se han extraído, la fibra se expone a los vapores del reactivo derivatizante en un horno durante un tiempo específico (5-40 minutos) y los analitos se derivatizan sobre la fibra. Esta es una de las opciones más habituales aunque también es una de las que más tiempo consume.

- **Derivatización en el puerto de inyección:** Para realizar este tipo de derivatización, los analitos son extraídos en la fibra y a continuación son desorbidos en el puerto de inyección a la vez que se produce su derivatización. En este caso el reactivo derivatizantes suele estar depositado en la fibra y no reacciona con los analitos (o lo hace en muy poca extensión) hasta que se introduce en el inyector para llevar a cabo la desorción o por otra parte, el derivatizante también puede ser inyectado segundos antes de introducir la fibra en el inyector. En ambos casos, al ser el derivatizante un reactivo muy volátil, sus vapores llenan el *liner* y se ponen en contacto con los analitos que se van desorbiendo. La reacción tiene lugar a altas temperaturas (220-340 °C) y en un corto espacio de tiempo (3-6 minutos), con lo que no se incrementa el tiempo de extracción ya que las dos etapas (desorción y derivatización) se realizan simultáneamente.

Se debe tener en cuenta que cuando la derivatización se realiza previa o simultáneamente a la extracción se puede incrementar la afinidad de los analitos por la fibra mejorando la eficacia del proceso. Sin embargo, cuando la derivatización tiene lugar una vez los compuestos han sido extraídos de la matriz, únicamente se consigue mejorar la separación cromatográfica y/o detección ya que los analitos han sido extraídos sin modificar químicamente su estructura.

4.3.1.D Consideraciones teóricas

A continuación se describe de forma resumida la teoría que gobierna la SPME y que a su vez se puede adaptar a otras técnicas no exhaustivas descritas a continuación como son la SBSE, la extracción con polímeros ab/adsorbentes de bajo coste y la FPSE.

La SPME se basa en un sistema de distribución de los analitos entre la matriz y el material extractante. En este tipo de sistemas pueden coexistir diferentes fases dependiendo del modo de muestreo por lo que las ecuaciones suelen ser complicadas al tener en cuenta todos los equilibrios posibles que se pueden producir. La teoría de SPME

en los casos de muestreo directo ha sido desarrollada por Louch et al. en 1992 [289] y permite obtener una correlación entre el número de moles extraídos en la fibra y la concentración inicial en la muestra.

En condiciones de equilibrio

En condiciones de equilibrio se cumple el siguiente balance de materia.

$$C_0 V_s = C_s V_s + C_h V_h + C_f V_f \quad [\text{ec. II.3}]$$

Donde:

- C_0 es la concentración inicial del analito en la muestra, C_s , C_h y C_f son respectivamente la concentración de analito en la muestra, en el espacio de cabeza y en la fibra una vez alcanzadas las condiciones de equilibrio.
- V_s , V_h y V_f representan el volumen de muestra, del espacio de cabeza y de la fibra respectivamente.

Si consideramos el volumen del espacio de cabeza mucho menor que volumen de muestra o que la afinidad de los analitos por dicho espacio es muy baja (para analitos poco volátiles) se puede despreciar este término. Considerando que la matriz es homogénea y no se producen otro tipo de ab/adsorciones (p.ej. paredes del vial o materia orgánica disuelta) y teniendo en cuenta las correspondientes constantes de distribución entre la fibra-espacio de cabeza, (K_{fh}) entra la fibra-muestra, (K_{fs}) y entre el espacio de cabeza-muestra (K_{hs}):

$$K_{fh} = \frac{C_f}{C_h} \quad K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad K_{hs} = \frac{C_h}{C_s}$$

se puede llegar a la ecuación II.4:

$$n_f = \frac{C_0 V_s V_f K_{fs}}{K_{fs} V_f + V_s} \quad [\text{ec. II. 4}]$$

Por tanto, se observa que el número de moles está directamente relacionado con la concentración inicial. Además, si asumimos que V_f es muy pequeño en comparación con V_s y por lo tanto, $K_{fs}V_f$ es mucho menor que V_s la ecuación II.4 se transforma en la ecuación II.5:

$$n_f = C_0 V_f K_{fs} \text{ [ec. II. 5]}$$

En este caso podemos observar que en condiciones de equilibrio la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de muestra y solo depende de la concentración inicial, del tipo de fibra usada y de la afinidad del analito por la fibra. En el caso de extracciones en espacio de cabeza, entra en juego una tercera fase además de las dos ya existentes (la muestra y la fibra) y la teoría ha sido desarrollada más tarde [290] por lo que teniendo en cuenta esta nueva fase la ec. II.5 se transforma en la ec. II.6, realizando las simplificaciones al igual que en la anterior situación se llega a conclusiones similares.

$$n_f = \frac{C_0 V_s V_f K_{fs}}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \text{ [ec. II.6]}$$

En condiciones de no equilibrio

Muchas veces las condiciones de equilibrio tardan en alcanzarse por lo que se trabaja en condiciones cinéticas al emplear tiempos de extracción menores y las ecuaciones descritas en la parte superior no pueden aplicarse. En este caso el sistema se rige por las ecuaciones de transferencia de masa. La teoría fue desarrollada por Ai en 1997 [291] y se expone de forma resumida a continuación.

La transferencia de masa desde la muestra a la fibra es la etapa que determina la velocidad con la que se alcanza el equilibrio, lo que se puede describir de acuerdo con la Ley de Fick:

$$F = \frac{1}{A} \frac{dn}{dt} \text{ [ec. II.7]}$$

Donde:

- F es el flujo másico de analito.
- n es la cantidad de analito en un tiempo t.
- A es la superficie del recubrimiento polimérico de la fibra.

Teniendo en cuenta varias consideraciones como que el analito tiene un gradiente lineal de concentración en la fase polimérica y que la difusión en fase gas es muy rápida, se llega a una ecuación diferencial que se resuelve al considerar que a $t=0$ la concentración en la fibra es 0 y se obtiene que la cantidad de analito extraída en un tiempo t viene dado por la siguiente ecuación:

$$n=(1-e^{-at}) \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad [\text{ec. II.8}]$$

Donde:

$$a=2Am \frac{kK_{fs} V_f + kK_{hs} V_h + kV_s}{2mK_{fh} V_f V_s + kK_{hs} V_f V_h + kV_f V_s}$$

Siendo m el coeficiente de transferencia de masa en la fibra y k la constante de evaporación del analito.

En esta ecuación se demuestra la existencia de una relación lineal entre la cantidad de muestra sobre la fibra (n) y la concentración inicial en la muestra (C_0) siempre y cuando el resto de variables se mantengan constantes (velocidad de agitación, volúmenes de muestra, espacio de cabeza y fibra). Cuando el tiempo de muestreo aumenta hasta alcanzar el equilibrio el término exponencial toma el valor de cero y la ecuación II.8 se convierte en la ecuación II.6 ya que el sistema se encontraría en una situación de equilibrio.

4.3.1.E Parámetros que afectan a la SPME

A continuación se describen los principales parámetros que afectan a la eficacia de SPME. Estos pueden ser adaptados a otras técnicas de extracción no exhaustivas basadas en la ab/adsorción como SBSE, la extracción con polímeros ab/adsorbentes de bajo coste o FPSE [172, 277, 280, 292].

- **Tipo de recubrimiento y espesor de fase**

El tipo de material que recubre la fibra es determinante en la extracción de los analitos ya que va a condicionar su afinidad por la fase sólida así como la cantidad de analito retenida en ella y la cinética de la extracción. Como norma general se buscan fibras con recubrimientos de polaridad similar a la de los analitos para favorecer su extracción. Hoy en día el gran número de recubrimientos y espesores disponibles hace que SPME pueda ser aplicada para la extracción de un gran número de compuestos en un amplio rango de polaridades. En la tabla II.19 se recogen las principales fibras comerciales, sus espesores y polaridades.

Tabla II.19. Tipos y características de los recubrimientos de las fibras de SPME disponibles en la actualidad.

Recubrimiento	Espesor (μm)	Polaridad
PDMS	100 ^a	Apolar
	30 ^a	
	7 ^a	
PDMS/DVB	60 ^{a, b}	Semipolar
	65 ^b	
CAR/PDMS	75	Semipolar
	85 ^b	
DVB/CAR/PDMS	50/30 ^b	Polar/apolar
PA	85 ^a	Polar
PEG	60	Polar

^a Comercializadas para su uso también con LC. ^b Disponible versión StableFlex con una fibra de núcleo de sílice fundida que es más resistente y flexible.

Los recubrimientos de PDMS y PA son recubrimientos homogéneos, en el primer caso se trata de un polímero líquido muy empleado para la extracción de compuestos poco polares, mientras que en el segundo es un polímero sólido aunque con muy baja densidad y se emplea para la extracción de compuestos polares. En ambos materiales los compuestos son retenidos principalmente por fenómenos de absorción [293]. El resto de polímeros se consideran recubrimientos heterogéneos donde partículas sólidas de polímeros porosos de DVB o CAR se encuentran suspendidas en el seno de un polímero líquido de PDMS. El principal mecanismo de retención suele ser por adsorción sobre dichas partículas aunque también se produce una cierta retención física que varía dependiendo del tamaño del poro.

En cuanto al espesor de la fase influye de manera que a mayor grosor de la fase mayor será la cantidad ad/absorbida ya que si aumenta V_f en [ec. II. 5] aumentará n , por otra parte al aumentar el espesor de la fase, más lenta será la transferencia de materia y por lo tanto el tiempo en alcanzar el equilibrio será mayor.

- **Tiempo de extracción**

Una de las principales variables que afectan a la SPME es el tiempo que se expone la fibra al contacto con la muestra. Al tratarse de una extracción que se rige por las leyes del equilibrio, pequeñas variaciones en el tiempo tienen efectos muy diferentes en la respuesta obtenida para los analitos. La situación ideal sería aquella en la que el sistema se mantiene en contacto hasta que se ha alcanzado el equilibrio por lo que pequeñas modificaciones en el tiempo de extracción no afectarían significativamente a la respuesta. Sin embargo en algunas ocasiones el sistema tarda en llegar al equilibrio un tiempo considerable y por cuestiones de practicidad se decide trabajar en la zona de no equilibrio por lo que una pequeña variación en el tiempo de igual magnitud a la producida en una situación de equilibrio conllevará una mayor imprecisión. En dicha situación, es necesario que los tiempos de extracción sean muy reproducibles para evitar una excesiva variabilidad en la cantidad de analito extraída [172, 280].

- **Temperatura**

La temperatura es un parámetro que tiene efectos contrapuestos. Por una parte aumenta la difusión de los analitos hacia la fibra y favorece el paso de los analitos al HS. Por otra parte, al ser la extracción un proceso exotérmico, la cantidad de analito extraído cuando se trabaja en condiciones de equilibrio es menor al aumentar la temperatura, ya que la constante de distribución entre la fibra y la muestra K_{fs} es inversamente proporcional a la temperatura según se observa en la ecuación II. 9 [172, 277, 280, 292].

$$K_{fs} = K_0 e^{-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} \quad [\text{ec. II.9}]$$

Donde:

- K_{fs} es la constante de distribución a una temperatura T .

- K_0 es la constante de distribución a la temperatura de referencia T_0 (temperatura absoluta).

-R es la constante de los gases.

- ΔH es el cambio en la entalpía molar y se considera constante en los intervalos de temperatura de trabajo habituales en SPME.

- **Agitación**

El uso de agitación en SPME favorece un mayor contacto entre los analitos y la fibra cuando se trabaja en inmersión. Por otra parte cuando se trabaja en HS, la agitación favorece el paso de los analitos menos volátiles al espacio gaseoso con lo que en ambos casos se favorece la cinética de las extracciones. Para llevar a cabo la agitación se suelen emplear barras magnéticas recubiertas de algún material inerte (PTFE en su mayoría) para disminuir al máximo la adsorción de los compuestos más apolares sobre ellas. Otros métodos de agitación como la energía de ultrasonidos (US) o la vibración de la fibra en los sistemas automatizados son poco aceptados por la posibilidad de degradación de los analitos o la rotura de la fibra [172, 277, 280, 292].

- **Volumen de muestra**

Se puede considerar que al aumentar el volumen de muestra aumentan los moles de analito extraídos como se deduce de la [ec.II.4]. Sin embargo si el volumen de muestra se hace mucho mayor que $K_{fs}V_f + K_{hs}V_h$ (ver [ec.II.6]) el número de moles extraídos se mantendrá constante [172, 277, 280, 292].

- **Volumen del espacio de cabeza**

Se suele preferir trabajar con volúmenes de espacio de cabeza bajos, tanto si es una extracción en inmersión (para minimizar la cantidad de analitos que pasan al espacio de cabeza) como si trabaja en HS [172, 277, 280, 292].

- **Efecto salino**

La presencia de una sal en la muestra (NaCl o KCl) provoca un aumento en la fuerza iónica de la disolución y los efectos serán diferentes dependiendo de la naturaleza de los analitos. En el caso de especies polares no iónicas, las moléculas de agua tenderán a solvatar los iones de la sal lo cual produce una disminución de la solubilidad de los analitos y se forzará su paso a la fase extractante aumentando así su extracción. Por el contrario para las especies iónicas el efecto será el contrario ya que la sal genera un

aumento en el coeficiente de actividad con lo que se produciría una peor eficacia extracción [172, 277, 280, 292].

- **Efecto del pH**

La extracción de los analitos en su forma neutra es más favorable que en el caso de especies iónicas debido a la naturaleza del extractante. Por lo tanto el pH tendrá un papel fundamental en aquellos analitos susceptibles de ser ionizables. Así para especies ácidas, pH inferiores al pK_a favorecerán la extracción puesto que aumentará la concentración de la forma neutra en la disolución. Por el contrario, la eficacia de la extracción para especies básicas se favorecerá a pH mayores que el pK_a . A la hora de trabajar a diferentes pH se debe tener en cuenta el rango de estabilidad de la fibra para evitar dañarla (ver tabla II.18), siendo indispensable trabajar en espacio de cabeza cuando las condiciones de acidez o alcalinidad son muy drásticas [172, 277, 280, 292].

- **Presencia de otros disolventes**

En general la presencia de disolventes orgánicos suele aumentar la solubilidad de los analitos en agua por lo que la eficacia de la extracción disminuye. Sin embargo para ciertos compuestos muy apolares la adición de pequeñas cantidades de disolventes (p.ej. MeOH) evita la adsorción de los analitos sobre las paredes del vial lo cual se traduce en un incremento en la extracción. Además, la interacción entre la fibra y los analitos puede verse modificada y favorecer su extracción [172, 277, 280, 292].

4.3.1.F Ventajas e inconvenientes de la SPME

Las principales ventajas de la SPME están asociadas con la ausencia de disolventes orgánicos, en algunos casos tóxicos y que generan residuos difíciles de eliminar. Por otra parte se puede destacar también una mínima manipulación de la muestra y fácil automatización con el acoplamiento de unidades específicas en el caso de GC. El coste es relativamente bajo ya que es necesaria muy poca instrumentación para su puesta a punto y las fibras pueden reutilizarse aproximadamente entre 100 y 200 veces lo que hace que se trate de un dispositivo relativamente barato comparado con otros medios de extracción, como p. ej. SPE. Además, la SPME se puede aplicar a un amplio rango de

compuestos y matrices pudiendo llevarse a cabo muestreos *in situ* y acoplarla tanto a GC como LC.

Entre los inconvenientes, cabe destacar los siguientes: posibilidad de efecto matriz durante la extracción y de sufrir efecto memoria debido a la reutilización de la fibra, especialmente cuando se trabaja con concentraciones elevadas. Además, a consecuencia del uso se produce un desgaste físico y mecánico que puede derivar en un desprendimiento total o parcial del polímero ya que la unión polímero-soporte es bastante frágil (a pesar de las mejoras en este campo). También puede producirse cierta irreproducibilidad al cambiar de fibra o lote con lo que la eficacia de extracción puede ser ligeramente diferente aún tratándose del mismo material. Finalmente, destacar la limitada capacidad de las fibras en comparación con SBSE lo que se traduce en eficacias de extracción bajas, y LOQs altos especialmente si la desorción tiene lugar en un cromatógrafo de líquidos y la poca aceptación que ha tenido su hibridación con la LC.

4.3.1.G Aplicación de la SPME a los analitos estudiados

- CANNABINOIDES Y ESTIMULANTES DE TIPO ANFETAMÍNICO

A pesar de ser muchas las publicaciones de SPME para la extracción de cannabinoides y ATS en muestras biológicas esas metodologías no se han trasladado al ámbito medioambiental, debido principalmente a los elevados LOQs de los métodos propuestos (varios ng mL⁻¹). Excepcionalmente, algunos autores se han limitado a validarlos parcialmente en disoluciones acuosas [294, 295].

Entre las drogas de abuso que se analizan mediante SPME en matrices biológicas (orina, sangre, plasma, saliva y pelo principalmente) se encuentran el THC, el cannabinol, el cannabidiol, la AMP, la MAMP y la MDMA, mientras que las aplicaciones para detectar MDA y MDEA son reducidas. La gran mayoría emplea fibras de PDMS mediante un muestreo en HS (pelo, sangre), sin embargo para saliva u orina se puede abordar la extracción mediante inmersión ya que se trata de muestras de menor complejidad. En cuanto a la derivatización, ambas familias podrían ser analizadas sin la necesidad de derivatizarlos puesto que su concentración en matrices biológicas suele ser del orden de

cientos de $\mu\text{g L}^{-1}$ o ng g^{-1} , sin embargo existen numerosas publicaciones en la que se emplean sililantes o acilantes para mejorar su determinación [296-298].

- BENZODIACEPINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS

La actual revisión bibliográfica solamente muestra tres referencias en las que DIA y LOR son analizados usando SPME en muestras acuosas [299-301]. Sin embargo en muestras biológicas es habitual el análisis de BZPs empleando SPME, siendo las fibras de PA y PDMS/DVB las más habituales. Además, es habitual trabajar en inmersión (aunque no es lo más aconsejable por el desgaste al que se somete la fibra) debido a la baja volatilidad de estos compuestos [296-298].

En la primera de las publicaciones para muestras medioambientales [300] el DIA se extrae conjuntamente con IBU, DIC, fenoprofeno y loratadina. Para ello se trabaja a pH ácido usando una fibra de DVB/CAR/PDMS. Transcurridos 35 minutos se aumenta el pH para extraer los compuestos básicos (entre ellos DIA) y se determinan conjuntamente usando GC-MS obteniendo un LOQ para DIA de 50 ng L^{-1} (ver tabla II.20). Sin embargo Unceta et al. [299] se mostraron críticos con este procedimiento debido a la posible desorción de los compuestos ácidos al aumentar el pH y propusieron realizar una extracción a dos valores de pH (3 y 11) en viales separados conteniendo 2 mL de muestra. La extracción se llevaba a cabo con una fibra de CW-TPR (carbowax-resina templada, no disponible en la actualidad). Transcurrido el tiempo de extracción ambas fibras eran desorbidas simultáneamente en una unidad especial que se acoplaba *online* a un LC-MS/MS con lo que se analizaban tanto compuestos ácidos como básicos en la misma inyección. Los LOQs para LOR y DIA eran de 10 ng L^{-1} . También Togunde et.al [301] propusieron el acoplamiento SPME-LC-MS/MS para la determinación de cinco fármacos antidepresivos y contra la ansiedad (entre ellos DIA) usando una fibra de C18 fabricada en el propio laboratorio. El uso de un sistema robótico que permitía la completa automatización de la extracción con muy poco consumo de muestra (1.8 mL) y buenos LOQs (20 ng L^{-1} para DIA).

- ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

En contraposición a lo que ocurre con los otros analitos objeto de esta Tesis, para los NSAIDs se han encontrado un mayor número de aplicaciones medioambientales empleando SPME acoplada a LC o GC como sistema de detección. Se pueden encontrar tanto metodologías en las que sólo se analizan NSAIDs [221, 222] como métodos multianalito [228, 299, 300, 302, 303].

A la vista de los métodos recogidos en la tabla II.20 se observa que todas las metodologías propuestas ajustan el pH de la muestra a un valor ácido (pH 2-3) para lograr la extracción de los compuestos en su forma neutra, excepto si las condiciones de derivatización exigen un medio básico. Además, debido a la naturaleza de los NSAIDs se prefiere el uso de fibras polares para su extracción como son las de PA [221, 228, 303, 304], CW-TPR [299] o DVB/CAR/PDMS [300]. El uso de fibras menos polares (PDMS o PDMS-DVB) también ha sido testado, en cuyo caso se suele realizar una derivatización *in situ* para mejorar la extractabilidad de los compuestos y obtener LOQs aceptables. Los reactivos empleados para este propósito son reactivos tales como el sulfuro de dimetilo (DMS) [222] o etilcloroformiato (EtCF) [302] ya que tanto ellos como los derivados formados son estables en disolución. Por otra parte existen autores que proponen una derivatización *on-fiber* posterior a la extracción con reactivos sililantes para mejorar la determinación de los mismos [221, 303]. De esta forma se obtienen LOQs menores de 40 ng L⁻¹, con lo que se mejora sustancialmente los LOQs obtenidos en metodologías que prescinden de esta etapa (con LOQs 0.1-16 µg L⁻¹).

El acoplamiento directo SPME-LC no es sencillo por lo que las aplicaciones son menos numerosas. Sin embargo, en el apartado correspondiente a BZPs se describe el procedimiento propuesto por Unceta et al.[299] en el que extraen entre otros analitos, NAP y DIC mediante SPME y desorción acoplada *online* a un LC-MS/MS obteniendo LOQs entre 5-10 ng L⁻¹ y una variabilidad menor del 11 %.

Tabla II.20. Resumen de los principales métodos recogidos en la bibliografía que analizan NSAIDs, BZPs y compuestos relacionados en muestras acuosas mediante SPME y MS/(MS)

Analitos ^a	Volumen/mL	Tratamiento muestra	Modo	Tipo fibra	T ^a , tiempo extracción	Derivatización (condiciones)	Determinación	LOQ ngL ⁻¹	Ref
IBU, NAP, KET, DIC	22 R	Ajuste a pH 3	DI	PA (85 µm)	T ^a amb, 40 min	On-fiber (post extracción) MTBSTFA (40 °C, 20 min)	GC-(IT)-MS (SCAN)	15-40	[221]
IBU, NAP	4 R, S	Ajuste a pH 2, NaCl	DI	PA (85 µm)	T ^a amb, 30 min	--	GC-(Q)-MS (SIM)	600-16000 ^b	[228]
IBU, NAP	6 R, S	Ajuste a pH 6, Na ₂ SO ₄	HS	PDMS (100 µm)	70 °C, 45 min	In-situ DMS y TBA-HSO ₄ (70 °C, 10 min)	CG-(Q)-MS (SIM)	1-9	[222]
IBU, NAP, KET	11 R, S	Ajuste a pH 10	DI	PDMS-DVB (65 µm)	70 °C, 60 min	In-situ EtCF (EtOH/piridina) (70 °C, 60 min)	GC-(Q)-MS (SIM)	500	[302]
IBU, DIC, DIA	25 R	Ajuste a pH 2.5/7	DI	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm)	65 °C, 50 min	--	GC-(Q)-MS (SIM)	50-1430	[300]
NAP, DIC, DIA, LOR	2 R	Ajuste pH a 3 (NAP y DIC) Ajuste a pH 11 (DIA y LOR) NaCl	DI	CW-TPR (50 µm)	75 °C, 30 min	--	LC-(QqLT)-MS/MS (MRM)	5-10	[299]
IBU	2 R	Ajuste a pH 2	DI	PA (85 µm)	T ^a amb, 30 min	--	GC-(Q)-MS (SIM)	100	[304]
IBU, NAP, KET	40 R	Ajuste a pH 3	DI	PA (85 µm)	40 °C, 125 min	On-fiber (post extracción) BSTFA, 1 % TMCS (35 °C, 30.5 min)	GC-(Q)-MS (SIM)	25-30	[303]

^a Sólo se recogen los estudiados en esta Tesis. ^b LOQ Estimado a partir del LOD. R: Agua residual (influyente y/o efluente), S: agua superficial (río y/o lago). T^a amb: temperatura ambiente. DMS: sulfuro de dimetilo, EtCF: Etilcloroformiato, DMS: dimetilsulfato, EtOH: Etanol.

4.3.2 EXTRACCIÓN MEDIANTE ABSORCIÓN SOBRE BARRAS AGITADORAS

La extracción mediante absorción sobre barras agitadoras (*stir-bar sorptive extraction, SBSE*) se presentó en 1999 [305] como una alternativa a la SPME. Esta técnica se caracteriza por un incremento en la cantidad de fase (entre 50-200 veces respecto a una fibra de SPME) lo que se traduce en mayores eficacias de extracción y en LODs más bajos para compuestos apolares. A pesar de su mayor coste instrumental se han publicado multitud de trabajos en los que SBSE se aplica a muestras biológicas, alimentarias y medioambientales [306-309]. A continuación se describe el modo de trabajo y su aplicación a los analitos estudiados en esta Tesis.

4.3.2.A Dispositivos comerciales

La SBSE consiste en una técnica de extracción no exhaustiva en la que una barra magnética de 1 o 2 cm de longitud se recubre de un material polimérico absorbente con un espesor entre 0.5 y 1 mm (equivalente a 24-126 μL de fase) como se puede observar en la figura II.21. El dispositivo fue comercializado por la compañía alemana Gerstel [310] bajo el nombre de Twister.

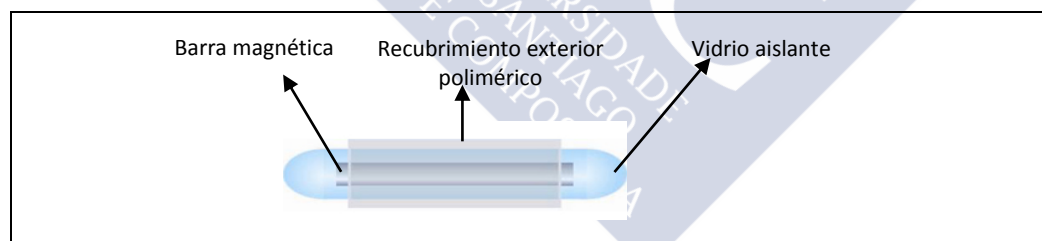


Figura II.21. Esquema de las partes de un Twister.

El PDMS fue el polímero que se empleó para su recubrimiento aunque recientemente se han puesto a la venta Twisters recubiertos de una mezcla de silicona-PEG (EG Silicone Twisters) y PA (estos últimos no disponibles en la actualidad aunque varios laboratorios han podido testarlos). A la vista de los primeros trabajos publicados, los Twister recubiertos de PEG y PA parecen ofrecer mejores eficacias de extracción para compuestos polares aunque todavía se dispone de muy pocas aplicaciones [311, 312]. Por otra parte algunos grupos de investigación han modificado el recubrimiento de las barras

agitadoras usando la tecnología “sol-gel” para la fabricación de polímeros y así poder adaptarlos a sus necesidades, sin embargo no se trata de una práctica muy habitual y las aplicaciones todavía son limitadas [306, 308, 309, 313].

4.3.2.B Modo de trabajo

Al igual que en SPME el modo de trabajo se divide en dos etapas. En la primera etapa el Twister se pone en contacto con la muestra y los analitos se van absorbiendo sobre el recubrimiento polimérico a la vez que se va agitando la muestra. Se puede trabajar tanto en inmersión como en HS usando para ello unos soportes especiales con lo que SBSE se puede aplicar a muestras líquidas, sólidas o semisólidas. En una segunda etapa se procede a la desorción de los analitos absorbidos en el dispositivo de extracción [307]. Debido al mayor tamaño del dispositivo no es posible realizar una desorción térmica directamente en el inyector como ocurre en SPME y es necesario disponer de un sistema de termodesorción específico (TDU) que se acopla al inyector del cromatógrafo y que ha sido desarrollado también por Gerstel [314]. En caso de no disponer de esta unidad o de realizar la determinación en un cromatógrafo de líquidos (hasta el momento no se ha diseñado una interfase para el acople con LC) los Twisters se desorben en un vial en contacto con un disolvente adecuado. En este caso los LODs alcanzados no serán tan bajos como en el caso de la desorción térmica ya que solo una pequeña proporción de los analitos extraídos será introducida en el sistema (1-10 μL).

4.3.2.C Derivatización

El uso de Twisters con recubrimientos apolares (PDMS) obliga a llevar a cabo una reacción de derivatización si se pretende determinar compuestos polares ya que los derivados formados son menos polares y en consecuencia se consigue una eficacia de extracción mayor. De forma similar a SPME, se puede hablar de derivatización *in-situ* (añadiendo el derivatizante directamente al vial que contiene la muestra), *on-stir bar* (cuando la reacción de derivatización tiene lugar sobre el recubrimiento del Twister, bien sea porque éste ha sido dopado previamente o porque se ha expuesto a los vapores del derivatizante) y *post extracción* (ya sea por adición del derivatizante sobre el extracto líquido en el que se ha desorbido el Twister o bien térmicamente). La derivatización

térmica en ausencia de disolventes es ligeramente diferente a la que se realiza en SPME ya que se lleva a cabo en el TDU en lugar de en el inyector propiamente dicho. Para ello, es necesario introducir el Twister junto con un capilar de vidrio que contenga el derivatizante dentro de la cavidad habilitada en el TDU para la desorción (*liner* TDU). Este proceso es conocido como *in-tube silylation* y es uno de los más usados cuando se combina SBSE con reactivos sililantes. [306, 315, 316].

4.3.2.D Teoría

El modelo matemático que explica la absorción en SBSE es muy similar al desarrollado para SPME y fue descrito por Baltussen et al. [305]. En su desarrollo matemático asimilar que K_{fs} para los Twisters de PDMS son similares a K_{ow} por lo que la cantidad total de analito extraída con SBSE se rige por la ecuación II.10:

$$\frac{m_f}{m_0} = \frac{K_{ow}/\beta}{1 + (K_{ow}/\beta)} \text{ [ec. II.10]}$$

Donde m_f y m_0 son las masas de analito absorbidas en el Twister y la masa en el momento inicial respectivamente, y $\beta = V_s/V_f$, siendo V_s y V_f el volumen de muestra y de PDMS respectivamente. Como puede observarse esta ecuación es análoga a la descrita en el apartado de teoría para la SPME [ec. II.4] con lo que puede concluirse que los fundamentos y los parámetros que afectan a ambas técnicas son los mismos.

En la figura II.22 se muestra la eficacia de extracción teórica obtenida para diferentes volúmenes de fase en función de K_{fs} , considerando un volumen de muestra de 25 mL, en una situación de equilibrio y sin espacio de cabeza para simplificar los cálculos. De esta forma se puede observar que las eficacias obtenidas con SPME (fibra de 1 cm de longitud y 100 μm de espesor equivalentes a 0.5 μL de fase), serán menores que las obtenidas por ejemplo con un Twister (volumen de fase entre 24-126 μL), siendo las diferencias más importantes para los analitos con K_{fs} intermedias [307].

4.3.2.E Ventajas e inconvenientes

La SBSE comparte muchas de las ventajas e inconvenientes con la SPME. Sin embargo, la posibilidad de usar dispositivos con un mayor espesor de fase se convierte en

uno de los puntos fuertes frente a la técnica propuesta por Pawliszyn ya que se consiguen LODs más bajos.

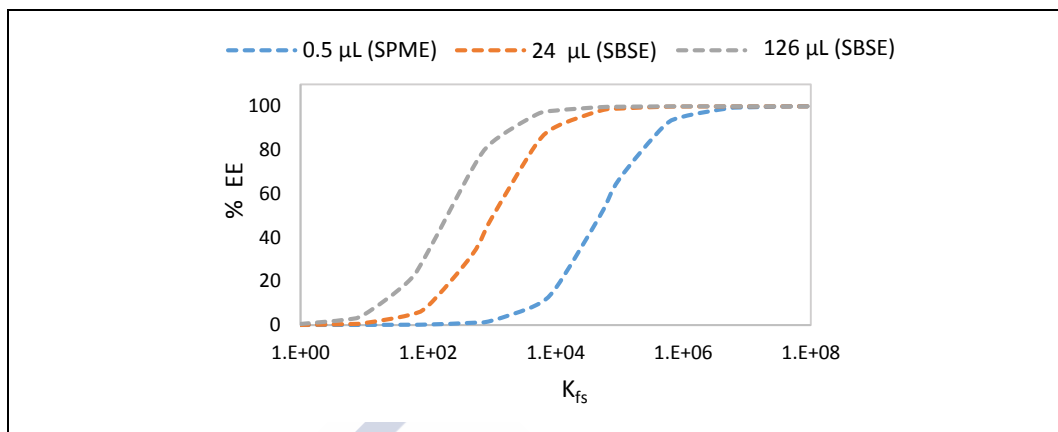


Figura II.22. Eficacia de extracción (EE) teórica en función del volumen de fase empleado y la K_{fs} .

Una de las principales limitaciones de esta técnica es el elevado precio de los dispositivos de extracción que obliga a su reutilización varias veces con lo que los problemas de efecto memoria pueden ser significativos al igual que la posibilidad de desprendimiento del material que recubre la barra agitadora tras numerosos ciclos de extracción (al igual que para SPME). Además, el número de recubrimientos para compuestos polares es bastante limitado, lo que obliga a realizar una derivatización si se quiere obtener una sensibilidad elevada. Por otra parte los tiempos de equilibrio son más altos que en SPME y suelen oscilar entre 3-24 horas, aunque este inconveniente puede ser solventado con extracciones simultáneas de varias muestras empleando para ello agitadores multiposición.

4.3.2.F Aplicación de la SBSE a los analitos estudiados

La extracción de drogas de abuso, BZPs y compuestos relacionados mediante SBSE no ha sido abordada hasta el momento, posiblemente debido a la polaridad de los analitos que implica obligatoriamente llevar a cabo una reacción de derivatización si se quieren detectar a niveles traza (ng L^{-1}). Sin embargo, sí se ha aplicado a la extracción de NSAIDs.

En un artículo publicado por Quintana et al. [124] se llevó a cabo la extracción de IBU, NAP, KET y DIC junto con otros 41 compuestos ácidos y polares usando un Twister de PDMS. La etapa de extracción duró 240 minutos y la desorción se realizó en 200 μ L de AcOEt y los analitos fueron derivatizados y determinados por GC-MS inyectando grandes volúmenes (LVI-GC-MS). Comparando estos límites con los publicados anteriormente para la extracción de 6 NSAIDs (IBU, NAP, KET, DIC y los ácidos tolfenámico y meclofenámico) [123], empleando SPME (fibra de PA) y similares condiciones de determinación se observan LODs ligeramente mayores en el caso de SBSE (13-21 ng L⁻¹ frente a 5-13 ng L⁻¹ para SPME). Esto puede atribuirse a que el recubrimiento apolar del Twister (frente al empleo de una fibra polar en SPME) no es el más adecuado para la extracción de NSAIDs, más que a la pérdida de sensibilidad por desorción en un disolvente e inyección empleando inyección de grandes volúmenes. De hecho un trabajo publicado por van Hoeck et al. [317] para la extracción de IBU, NAP y KET junto con otros fármacos y disruptores endocrinos, la desorción se realizaba mediante TDU y los LODs obtenidos eran del mismo orden (30-45 ng L⁻¹). En otro artículo, Silva et al. [318] compararon la extracción con barras agitadoras recubiertas de poliuretano (PU, sintetizado en el propio laboratorio) y PDMS para la extracción de IBU, DIC, NAP y otros NSAIDs consiguiendo mejores eficacias de extracción con la barra de PU (78-91 % frente al 10-43 % para PDMS) demostrando una vez más las limitaciones de los Twisters de PDMS para analitos polares.

4.3.3 EXTRACCIÓN CON POLÍMEROS AB/ADSORBENTES DE BAJO COSTE

La extracción con polímeros ab/adsorbentes de bajo coste se ha propuesto como una alternativa al empleo de las técnicas de extracción con ab/adsorbentes sólido existentes hasta el momento, ya que las principales limitaciones que presentan son la baja cantidad de fase (SPME) y el elevado precio de los dispositivos comerciales (SPME y SBSE) que hace obligatoria su reutilización con los consiguientes problemas de efecto memoria y de desgaste mecánico/químico que esto supone. Con el uso de polímeros ab/adsorbentes de bajo coste se pretende solventar, al menos parcialmente, algunos de los principales inconvenientes de SPME y SBSE ya que no es necesaria su reutilización. A continuación se describen las principales características y aplicaciones de esta técnica.

4.3.3.A *Dispositivos, modos de trabajo y consideraciones teóricas*

Los polímeros ab/adsorbentes se pueden encontrar en varios formatos: discos o láminas, tubos o cuerdas como se muestra en la figura II.23 y son comercializados principalmente para otros usos industriales. Su tamaño puede ser seleccionado según las necesidades, aunque lo habitual es recortar trozos de 1 cm de longitud o 0.25 cm^2 (en el caso de láminas) para facilitar su desorción en un volumen muy pequeño (50-250 μL).

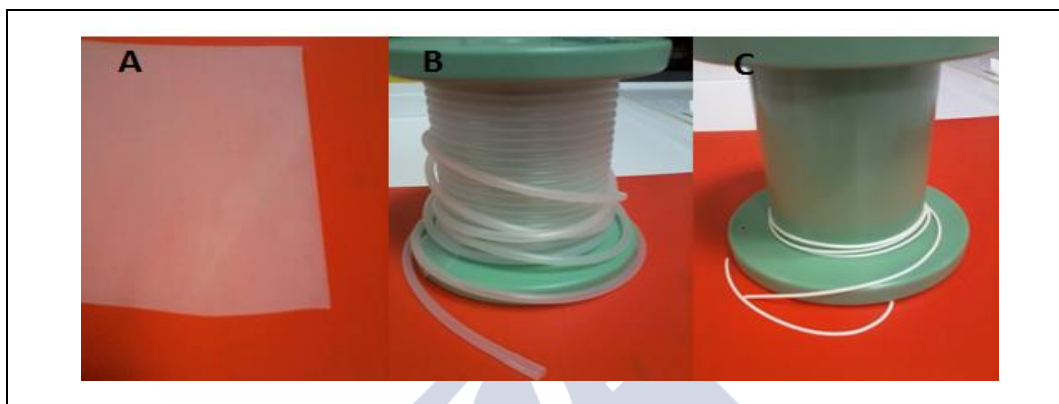


Figura II.23. Diferentes formatos de materiales ab/adsorbentes. A: hoja o lámina, B: tubo hueco y C: cuerda.

Los materiales que se han usado en esta Tesis son las siliconas de grado técnico (PDMS), polietersulfona (PES) y polipropileno (PP) y sus estructuras son las que se muestran en la figura II.24. En este caso se han seleccionado tres de ellos por ser los que poseen aplicaciones ya publicadas en el campo de la Química Analítica aunque el número de materiales que se se pueden usar es muy amplio y muchos de ellos están aún sin explorar.

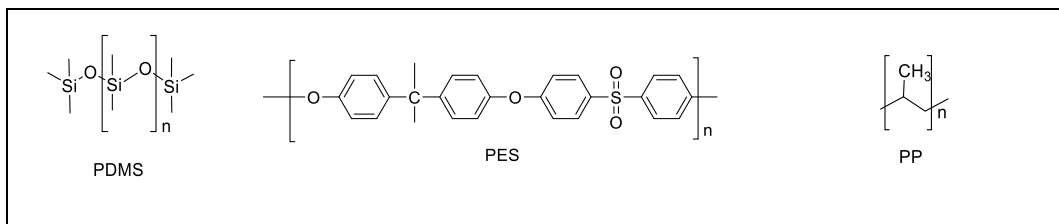


Figura II.24. Estructura de los principales polímeros porosos utilizados como ab/adsorbentes

La teoría aplicable para esta técnica de extracción es la que se ha descrito en el apartado correspondiente a SPME y SBSE [319]. El modo de trabajo es idéntico al de SBSE

por lo que la extracción puede ser realizada tanto en modo HS (con lo que puede aplicarse a matrices líquidas que contengan compuestos volátiles o a aquellas de naturaleza sólida y/o semisólida) [319-323] como en inmersión [319, 324-326].

Una vez realizada la extracción, el método de desorción más extendido es el llevado a cabo en un disolvente ya que no necesita instrumentación adicional [319, 322, 324, 325], sin embargo también puede realizarse térmicamente para el PDMS (250 °C, 5-10 min) usando el TDU diseñado para SBSE [323, 327].

Además se pueden llevar a cabo reacciones de derivatización para mejorar la extracción/determinación de los analitos como se ha descrito en el apartado 4.3.2.C para SBSE. Su bajo precio, unido a su estabilidad, ha permitido aplicarlos como dispositivos de muestreadores pasivos [319, 328-330] o como dispositivo para almacenar muestras durante un período largo de tiempo, ahorrando costes de espacio y evitando la degradación de los analitos [321, 326].

4.3.3.B Ventajas e inconvenientes

La extracción con polímeros adsorbentes comparte con SPME y SBSE todas sus ventajas a las que se suman el bajo precio de los dispositivos que permite desecharlos tras su uso y la mayor cantidad de fase disponible con lo que generalmente se consiguen LODs más bajos. Además no se requiere de un soporte adicional para el material extractante como puede ocurrir en el caso de SPME o SBSE con lo que se gana en flexibilidad y facilidad de manipulación y la extracción se puede realizar de forma completamente desatendida ya que no hay posibilidad de que se produzcan desprendimientos o roturas del material extractante.

Entre sus inconvenientes cabe destacar el tiempo necesario para llegar al equilibrio (4-24 horas) mucho mayor que para SPME ya que por su geometría y cantidad de fase hacen que el proceso de ab/adsorción sea más lento (especialmente en los formatos tubo o cuerda), aunque comparado con SBSE los tiempos de equilibrio son similares. Este inconveniente puede solventarse parcialmente con el uso de agitadores multiposición en los que se pueden realizar hasta 15-60 muestras a la vez. Al igual que

para SBSE no se dispone de un mecanismo de automatización, si bien es una técnica muy sencilla y de muy fácil manipulación.

4.3.3.C Aplicaciones

La extracción con polímeros ab/adsorbentes de bajo coste es relativamente reciente, la primera aplicación se publicó en 2004 [327] en la que fibras de PDMS fueron aplicadas como material absorbente para extraer compuestos clorados de muestras acuosas al nivel de ng L^{-1} . El uso de PDMS ha tenido buena aceptación y han sido múltiples las aplicaciones que se han descrito [322, 324, 325, 331, 332], sin embargo una de sus limitaciones es la baja afinidad por los compuestos más polares [333, 334]. A raíz de esto se han validado otros materiales como PES [333-336] o PP. Las fibras de PP se habían usado tradicionalmente como soportes para LPME [337, 338] alojando en su interior un disolvente o una mezcla para la extracción de compuestos en matrices acuosas. Más tarde Müller et al. [339] demostraron que compuestos con valores de K_{ow} elevados podrían ser adsorbidos en las paredes de la fibra de PP a través de un equilibrio de partición sólido-liquido por lo que PP se podría usar como dispositivo de adsorción en sí mismo y así lo demostraron diferentes publicaciones [320, 334, 340].

En cuanto a las aplicaciones de los polímeros para los analitos estudiados en esta Tesis, hasta el momento no se ha descrito ningún trabajo para la extracción de drogas de abuso en muestras medioambientales. Solamente Paschke et al. [328] usaron polímeros de silicona en muestreadores pasivos para calcular los equilibrios de distribución de cinco fármacos que incluían IBU y DIC.

4.3.4 EXTRACCIÓN CON MATERIALES MODIFICADOS QUÍMICAMENTE

La ab/adsorción sobre materiales modificados químicamente (*fabric phase sorptive extraction, FPSE*) se trata de una novedosa técnica de extracción cuyo dispositivo de extracción ha sido desarrollado y patentado en 2014 por Abuzar Kabir y Kenneth Furton, de la Universidad Internacional de Florida (FIU) [341] y se basa en la ab/adsorción de los analitos sobre un soporte sólido inerte cuya superficie ha sido modificada en el laboratorio para mejorar su capacidad de retención.

4.3.4.A Síntesis y dispositivo

La síntesis de materiales para FPSE se hace a través de una reacción de polimerización con la que se consigue anclar el ab/adsorbente al soporte sólido usando para ello la tecnología “sol-gel” descrita con anterioridad por Malik et al. [342]. Esta reacción se lleva a cabo en condiciones suaves con lo que el nivel de uniformidad del recubrimiento es extremadamente alto y su grosor se puede ajustar controlando las condiciones y la proporción de los reactivos. Además no hay limitación en cuanto a la geometría del sustrato lo que permite recubrirlo tanto interna como externamente. De forma genérica el proceso se describe de la siguiente manera:

-Se prepara una disolución “sol” en la que se disuelve el polímero que actuará como ab/adsorbente (especie orgánica), el precursor inorgánico, el catalizador y el disolvente (o mezcla de disolventes) en el que se llevará a cabo la reacción. El número de ab/adsorbentes que se pueden anclar al soporte es muy amplia y va desde recubrimientos apolares (C8, C18, PDMS o polidimetildifenilsiloxano (PDMDPS)) hasta medios muy polares como PEG o PA. También se pueden polimerizar sobre la superficie del soporte MIPs, compuestos cargados o cualquier otro tipo de ab/adsorbentes creados al amparo de la tecnología “sol-gel”. Los monómeros de base sílice son los precursores inorgánicos más habituales para la síntesis del híbrido orgánico-inorgánico aunque también se pueden sintetizar usando otro tipo de materiales como puede ser el circonio o el titanio.

- Esta mezcla inicial se agita, centrifuga y a continuación se introduce el soporte sólido inerte (sobre el que se llevará a cabo la polimerización “sol-gel”) durante un tiempo determinado. El soporte sólido debe ser poroso, como p. ej. fibras sintéticas de nylon, poliéster, y/o poliamida. Sin embargo, una de las opciones preferidas es la celulosa debido a su flexibilidad, abundancia natural, biodegradabilidad y permeabilidad. Además, su estructura de homopolímero permite retener grandes cantidades de ab/adsorbente durante el proceso de recubrimiento.

- Pasado el tiempo establecido, el medio de FPSE se seca para eliminar todo los disolventes y permitir su curado. Una vez seco, se lava para eliminar todos los reactivos que hayan quedado sin reaccionar, se corta y almacena para su posterior uso. El

ab/adsorbente obtenido es permeable, flexible, fácil de manejar y puede ser recortado según las necesidades del usuario [343]. En la figura II.25 se observa esquemáticamente la estructura de un medio de polytetrahydrofurano (PTHF) polimerizado sobre celulosa.

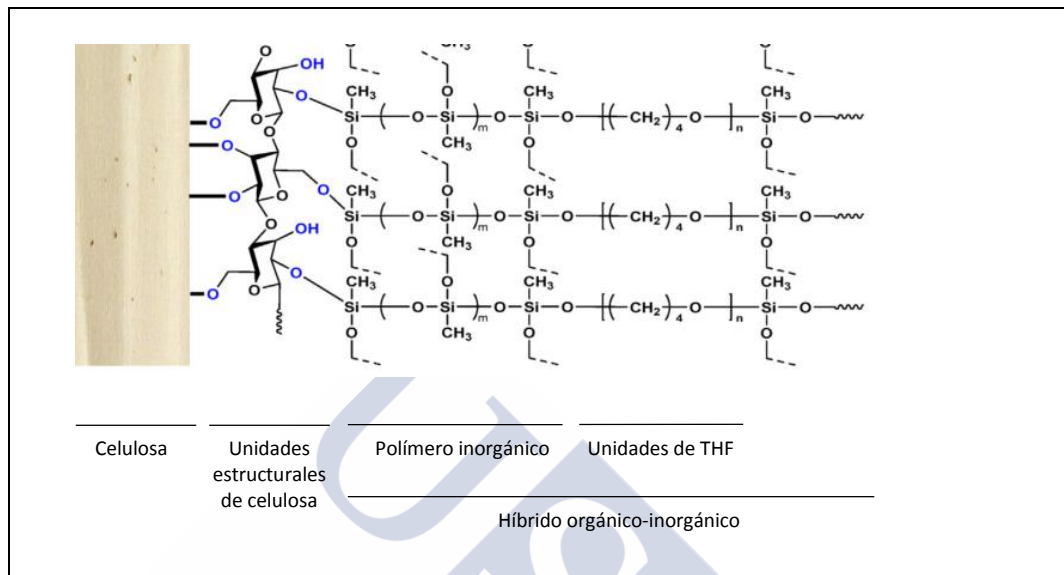


Figura II.25. Esquema de FPSE empleando PTHF y un soporte sólido de celulosa. Adaptado de Kumar et al. [344] con permiso de Elsevier.

4.3.4.B Modo de trabajo

El modo de trabajo es el mismo que el descrito en apartados anteriores para SBSE o los polímeros ab/adsorbentes de bajo coste. Una primera etapa de contacto con la matriz bajo agitación mecánica en la que los analitos quedan retenidos en el material ab/adsorbente y una segunda etapa en la que el dispositivo es desorbido en un pequeño volumen de disolvente ayudado (o no) por energía de ultrasonidos o agitación. Finalmente y previo a la inyección, el extracto puede ser filtrado (o centrifugado) en caso de observar partículas en suspensión. En la figura II.26 se puede observar un material de FPSE antes de ser sumergido en la muestra (A) y una segunda imagen mientras se está llevando a cabo la extracción (B).

4.3.4.C Ventajas e inconvenientes

Las principales ventajas de FPSE derivan de la tecnología “sol-gel” con la que se ha sintetizado. La FPSE presenta un notable incremento en la superficie respecto a otros

dispositivos ya que la superficie total de un dispositivo tipo (2 x 2.5 cm) es de 1000 mm² (teniendo en cuenta ambas caras), 10 veces mayor que la de un Twister y 100 veces mayor que la de una fibra de SPME.

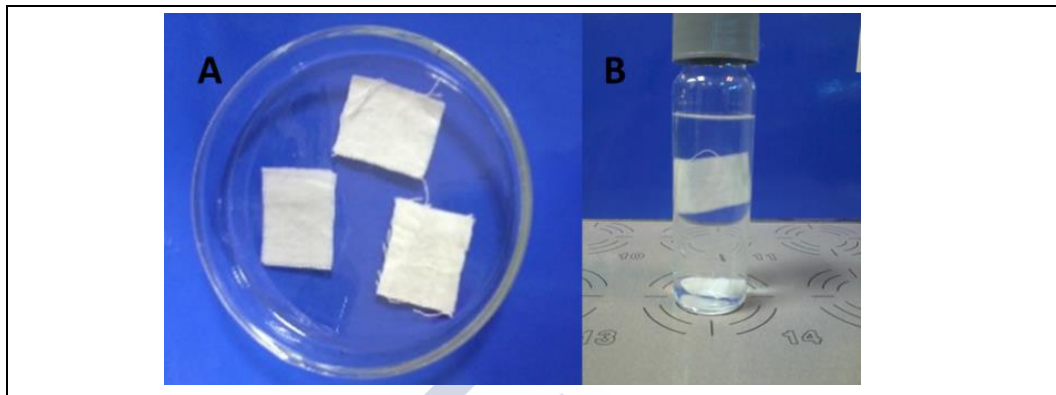


Figura II.26. Aspecto de la FPSE (2 x 2.5 cm), previo a la extracción (A) y (B) durante la extracción.

Su porosidad y su estructura abierta permiten una rápida transferencia de masa lo que conlleva a disminución considerable del tiempo de extracción necesario para alcanzar el equilibrio (menor de 40 minutos, dependiendo del volumen de muestra) en comparación con SPME, SBSE o polímeros ad/absorbentes de bajo coste. La gran variedad de recubrimientos aporta a FPSE una alta selectividad en comparación con SBSE o SPME y se traduce en un medio con una elevada eficacia de extracción, altamente sensible y selectivo. Por otra parte la formación de enlaces covalentes entre el sustrato y la red polimérica le confiere a la FPSE una alta estabilidad térmica y química con lo que se puede usar para extraer analitos de cualquier matriz líquida aunque se encuentre a pH extremos (1-13). Además, presenta un bajo consumo de disolventes (sólo necesarios para la desorción del material, aunque por su estabilidad podría ser desorbido térmicamente sin emplear disolventes).

Entre los inconvenientes a citar, poner de manifiesto su reciente puesta a punto con lo que todavía está por comprobar experimentalmente las características tan prometedoras de esta nueva técnica de extracción y que de momento no se encuentra disponible comercialmente.

4.3.4.D Aplicaciones

El primer trabajo que ha sido publicado empleando FPSE como técnica de extracción se basa en la determinación de estrógenos en muestras de orina y acuosas [344]. Para ello 10 mL de muestra (en el caso de la orina con una dilución 1:10) previamente filtrada se ponen en contacto con un medio de PTHF durante 20 minutos bajo agitación. Pasado ese tiempo el material de extracción se desorbe en 0.5 mL de MeOH durante 8 minutos y se inyecta en un LC con un detector de ultravioleta. Con esta metodología se obtuvo una eficacia de extracción próxima al 75 % y los parámetros de validación mostraron buena linealidad, repetibilidad excelente (RSD menor del 2 %) y LODs considerablemente más bajos que los descritos previamente usando UV o DAD y técnicas de extracción tradicionales (SPE, SPME o SBSE). Ya en 2015 se ha aplicado FPSE a la determinación de anfenicoles en leches [345] y triazinas en aguas [346].





5 REFERENCIAS

- [1] List of Psychotropic Substances under International Control (24th ed.). International Narcotic Control Board (INBC). United Nations, New York (2010).
- [2] Terminology and information on drugs (2nd ed.), United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Disponible en: [http:// www.unodc.org/pdf/publications/report_2003-09-01_1.pdf](http://www.unodc.org/pdf/publications/report_2003-09-01_1.pdf)
- [3] Glosario de términos de alcohol y drogas, Organización Mundial de la Salud (WHO). Ministerio de Sanidad y Consumo (España) 1994.
- [4] M. Ben Amar, J. Ethnopharmacol. 105 (2006) 1-25.
- [5] Drug profiles: scientific descriptions of drugs (cannabis), European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Disponible en: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/cannabis>. Último acceso: enero 2015
- [6] J.A. Ramos Atance, J.J. Fernández Ruiz; Cannabinoides: propiedades químicas y aspectos metabólicos. en: J. Bobes, A. Calafat, (eds). Monografía cannabis. Adicciones, Madrid (2000), pp. 41-59.
- [7] Base de datos Scifinder Scholar. <http://scifinder.cas.org>. Último acceso: enero 2015
- [8] R.C. Baselt, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, (7th ed.), Biomedical Publications, Foster City (2004).
- [9] M.A. Huestis, J.M. Mitchell, E.J. Cone, J. Anal. Toxicol. 20 (1996) 441-452.
- [10] S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli (Eds.) Illicit Drugs in the Environment: Occurrence, Analysis, and Fate Using Mass Spectrometry, Wiley, Hoboken (2011)
- [11] C. Ort, A.L.N. van Nuijs, J.D. Berset, L. Bijlsma, S. Castiglioni, A. Covaci, P. de Voogt, E. Emke, D. Fatta-Kassinos, P. Griffiths, F. Hernández, I. González-Mariño, R. Grabic, B. Kasprzyk-Hordern, N. Mastroianni, A. Meierjohann, T. Nefau, M. Östman, Y. Picó, I. Racamonde, M. Reid, J. Slobodnik, S. Terzic, N. Thomaidis, K.V. Thomas, Addiction 109 (2014) 1338-1352.
- [12] European Drug Report. Trends and developments 2014. Luxembourg (2014). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Disponible en: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_228272_DE_TDAT14001DEN.pdf

- [13] Encuesta general sobre alcohol y drogas en la población general en España (EDADES) 2011-2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Disponible en:
<http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>.
- [14] Informe anual 2012 (datos del 2011) al OEDT por el Punto Focal Nacional Reitox. España, evolución, tendencias y cuestiones particulares. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2012)
- [15] Perspectives on Drugs: synthetic drug production in Europe. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Disponible en:
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_212354_EN EMCDDA_POD_2013_Synthetic%20drug%20production.pdf
- [16] Drugs profiles: scientific descriptions of drugs (amphetamine), European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Disponible en:
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/amphetamine>.
Último acceso: enero 2015.
- [17] Drug profiles: scientific descriptions of drugs (methamphetamine), European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Disponible en:
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/methamphetamine>.
Último acceso: enero 2015
- [18] Drug profiles: scientific descriptions of drugs (MDMA), European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Disponible en:
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/mdma>. Último acceso: enero 2015
- [19] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, J. Watts, Clarke's Analysis of drugs and poisons. (4th ed) Pharmaceutical Press, London (2011).
- [20] S. Castiglioni, E. Zuccato, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, Mass Spectrom. Rev. 27 (2008) 378-394.
- [21] Oficina de las Naciones Unidas para las Drogas y el Crimen (UNODC), <http://www.unodc.org/unodc/en/index.html>. Último acceso: enero 2015.
- [22] Centro Europeo para el Control de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) <http://www.emcdda.europa.eu>. Último acceso: enero 2015.
- [23] Plan Nacional sobre Drogas <http://www.pnsd.msc.es>. Último acceso: diciembre 2014
- [24] C.G. Daughton, ACS Symp. Ser. 791 (2001) 348-364.

- [25] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, D. Calamari, R. Bagnati, S. Schiarea, R. Fanelli, *Environ. Health* 4 (2005) 1-14.
- [26] A.L.N. van Nuijs, B. Pecceu, L. Theunis, N. Dubois, C. Charlier, P.G. Jorens, L. Bervoets, R. Blust, H. Neels, A. Covaci, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 123-129.
- [27] A.L.N. van Nuijs, B. Pecceu, L. Theunis, N. Dubois, C. Charlier, P.G. Jorens, L. Bervoets, R. Blust, H. Neels, A. Covaci, *Water Res.* 43 (2009) 1341-1349.
- [28] P. Vázquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2851-2864.
- [29] S. Castiglioni, E. Zuccato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8421-8429.
- [30] M.R. Boleda, M.T. Galcerán, F. Ventura, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 38-48.
- [31] M.R. Boleda, M.T. Galcerán, F. Ventura, *Water Res.* 43 (2009) 1126-1136.
- [32] Assessing illicit drugs in wastewater: potential and limitations of a new monitoring approach. European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction (EMCDDA). Disponible en:
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_139185_EN_emcdda-insights-wastewater.pdf
- [33] A.L.N. van Nuijs, S. Castiglioni, I. Tarcomnicu, C. Postigo, M. López de Alda, H. Neels, E. Zuccato, D. Barceló, A. Covaci, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 3564-3577.
- [34] A.L.N. van Nuijs, K. Abdellati, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *J. Hazard. Mater.* 239-240 (2012) 19-23.
- [35] I. Senta, I. Krizman, M. Ahel, S. Terzic, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 659-665.
- [36] C. Ort, M.G. Lawrence, J. Rieckermann, A. Joss, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 6024-6035.
- [37] S. Castiglioni, L. Bijlsma, A. Covaci, E. Emke, F. Hernández, M. Reid, C. Ort, K.V. Thomas, A.L.N. van Nuijs, P. de Voogt, E. Zuccato, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2012) 1452-1460.
- [38] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 1027-1032.
- [39] K.V. Thomas, L. Bijlsma, S. Castiglioni, A. Covaci, E. Emke, R. Grabic, F. Hernández, S. Karolak, B. Kasprzyk-Hordern, R.H. Lindberg, M. López de Alda, A. Meierjohann, C. Ort, Y. Picó, J.B. Quintana, M. Reid, J. Rieckermann, S. Terzic, A.L.N. van Nuijs, P. de Voogt, *Sci. Total Environ.* 432 (2012) 432-439.

- [40] M.J. Reid, K.H. Langford, J. Morland, K.V. Thomas, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 35 (2011) 1593-1599.
- [41] T. Rodríguez-Álvarez, R. Rodil, R. Cela, J.B. Quintana, *J. Chromatogr. A* 1328 (2014) 35-42.
- [42] N. Mastroianni, M. López De Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1360 (2014) 93-99.
- [43] T. Rodríguez-Álvarez, R. Rodil, M. Rico, R. Cela, J.B. Quintana, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10274-10281.
- [44] S. Castiglioni, I. Senta, A. Borsotti, E. Davoli, E. Zuccato, *Tob. Control* 24 (2015) 38-42.
- [45] Glossary of Terms, U.S Food and Drug Administration (FDA). Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm079436.htm#D>. Último acceso: enero 2015
- [46] ATC System, World Health Organization (WHO). Disponible en: http://www.whocc.no/atc_ddd_index/. Último acceso: octubre 2014
- [47] Informe anual del Sistema Nacional de Salud, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2012). Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/infSNS2012.pdf>
- [48] Subgrupos ATC y principios activos de mayor consumo en el Sistema Nacional de Salud en 2010. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud*, 4 (2010) 124-128.
- [49] G. Burillo-Putze, A. Aldea-Perona, C. Rodríguez-Jiménez, M.M. García-Sáiz, B. Climent, A. Dueñas, P. Munné, S. Nogué, R.S. Hoffman, *An. Sist. Sanit. Navar.* 36 (2013) 99-114.
- [50] Emergency department visits for adverse reactions involving the insomnia medication Zolpidem. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Drug Abuse Warning Network (DAWN). Disponible en : <http://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/DAWN079/DAWN079/sr079-Zolpidem.pdf>.
- [51] Emergency department visits involving Attention deficit/hyperactivity disorder Stimulant medications. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Drug Abuse Warning Network (DAWN). Disponible en : <http://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/DAWN073/DAWN073/sr073-ADD-ADHD-medications.pdf>.

- [52] Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Centre for behavioral health statistics and quality. The DAWN Report: Highlights of the 2009 Drug Abuse Warning Network (DAWN) Findings on Drug-Related Emergency Department Visits. Rockville, MD. Disponible en:
<http://www.oas.samhsa.gov/2k10/DAWN034/EDHighlightsHTML.pdf>.
- [53] Drug profiles: scientific descriptions of drugs (Benzodiazepines), European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Disponible en:
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/benzodiazepine>.
Último acceso: enero 2015
- [54] The Ashton Manual. Benzodiazepines: How they work and how to withdraw. Proccol for the treatment of benzodiazepine withdrawal. Disponible en:
<http://www.benzo.org.uk/manual/index.htm>. Último acceso: diciembre 2014
- [55] C. Vicens Caldentey, F. Fiol Gelabert, Inf. Ter. Sist. Nac. Salud 32 (2008) 52-57.
- [56] R.C.O. Voshaar, J.E. Couvée, A.J.L.M. van Balkom, P.G.H. Mulder, F.G. Zitman, Brit. J. Psychiat. 189 (2006) 213-220.
- [57] Sexual assaults facilitated by drugs or alcohol. Lisbon (2008). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA). Available at:
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_50544_EN_TDS_sexual_assault.pdf
- [58] H. Depoortere, B. Zivkovic, K.G. Lloyd, D.J. Sanger, G. Perrault, S.Z. Langer, G. Bartholini, J. Pharmacol. Exp. Ther. 237 (1986) 649-658.
- [59] B. Lemmer, Physiol. Behav. 90 (2007) 285-293.
- [60] B.M. Kuehn, J. Am. Med. Assoc. 309 (2013) 645-646.
- [61] S.C. Licata, D.M. Penetar, S. Dunlap, S.E. Lukas, Eur. J. Pharmacol. 598 (2008) 64-67.
- [62] C.R. Rush, Pharmacol. Biochem. Behav. 61 (1998) 253-269.
- [63] B.E. Leonard, D. McCartan, J. White, D.J. King, Hum. Psychopharmacol. 19 (2004) 151-180.
- [64] Nota informativa de la AEMPS. Ref: 2009/01: Metilfenidato: actualización de las condiciones de uso. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Disponible en:
http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2009/docs/NI_2009-01_metilfenidato.pdf

- [65] D.A. Burgard, R. Fuller, B. Becker, R. Ferrell, M.J. Dinglasan-Panlilio, *Sci. Total Environ.* 450–451 (2013) 242–249.
- [66] W.A. Morton, G.G. Stockton, *J. Clin. Psychiatry* 2 (2000) 159–164.
- [67] S.L. Jaffe, *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiat.* 30 (1991) 773–775.
- [68] Physprop Database (Sycurance Research Corporation). www.srcinc.com. Último acceso: enero 2015
- [69] S. Luk, R.S. Atayee, J.D. Ma, B.M. Best, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 135–142.
- [70] J. Flórez, *Farmacología humana* (4ª ed). Masson, Barcelona (2003)
- [71] D. Capellà, J.R. Laporte, *Métodos aplicados en estudios descriptivos de utilización de medicamentos*. en: J.R. Laporte, G. Tognoni (eds), *Principios de epidemiología del medicamento*. 2ª ed, Masson-Salvat, Barcelona (1993). pp. 67–93. Disponible en: <http://www.icf.uab.es/pem/libro.htm>. Último acceso: febrero 2015
- [72] J. Simó Miñana, *Aten. Primaria* 44 (2012) 335–347.
- [73] Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). Utilización de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España durante el período 2000–2012. Disponible en : http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/ansioliticos_hipnoticos-2000-2012.pdf.
- [74] M.P. Vicente-Sánchez, D. Macías-Saint-Gerons, C. de la Fuente-Honrubia, D. González-Bermejo, D. Montero-Corominas, F. Catalá-López, *Rev. Esp. Salud Pública* 87 (2013) 247–255.
- [75] J.R. Vane, R.M. Botting, *Int. J. Tissue React.* 20 (1998) 3–15.
- [76] J. I. de Ahumada-Vázquez, M. L. Santana-Falcón, J. Serrano-Molina. *Farmacología práctica*, Díaz de Santos, Madrid (2002)
- [77] T. Reemtsma, M. Jekel (eds.), *Organic pollutants in the water cycle. Properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds*, Wiley-VCH, Weinheim (2006)
- [78] M. Petrović, D. Barceló (eds), *Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*, Elsevier, Amsterdam (2007)
- [79] P.J. Harrington, E. Lodewijk, *Org. Process Res. Dev.* 1 (1997) 72–76.
- [80] Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en España durante el período 2000–2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2013). Disponible en:

- <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/AINE.pdf>
- [81] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Environ. Int.* 36 (2010) 75-84.
- [82] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. *Chromatogr. A* 1218 (2011) 1620-1631.
- [83] Y. Valcárcel, F. Martínez, S. González-Alonso, Y. Segura, M. Catalá, R. Molina, J.C. Montero-Rubio, N. Mastroianni, M. López de Alda, C. Postigo, D. Barceló, *Environ. Int.* 41 (2012) 35-43.
- [84] D. Hummel, D. Loeffler, G. Fink, T.A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7321-7328.
- [85] L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibáñez, F. Hernández, J. *Chromatogr. A* 1216 (2009) 3078-3089.
- [86] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, M. González-Díez, R. Cela, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1708-1717.
- [87] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, J. *Sep. Sci.* 34 (2011) 1091-1101.
- [88] J.D. Berset, R. Brenneisen, C. Mathieu, *Chemosphere* 81 (2010) 859-866.
- [89] S. Terzic, I. Senta, M. Ahel, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2686-2693.
- [90] A.L.N. van Nuijs, J.F. Mougel, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, J. *Environ. Monitor.* 13 (2011) 1008-1016.
- [91] R.J. Irvine, C. Kostakis, P.D. Felgate, E.J. Jaehne, C. Chen, J.M. White, *Forensic Sci. Int.* 210 (2011) 69-73.
- [92] K.J. Bisceglia, A.L. Roberts, M.M. Schantz, K.A. Lippa, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2701-2712.
- [93] A.C. Chiaia, C. Banta-Green, J. Field, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8841-8848.
- [94] C. Metcalfe, K. Tindale, H. Li, A. Rodayan, V. Yargeau, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3179-3185.
- [95] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3123-3134.
- [96] V. Borova, N. Maragou, P. Gago-Ferrero, C. Pistos, N. Thomaidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1-13.
- [97] T. Nefau, S. Karolak, L. Castillo, V. Boireau, Y. Levi, J. *Total Environ.* 461-462 (2013) 712-722.
- [98] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, *Chemosphere* 89 (2012) 1399-1406.

- [99] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1748-1760.
- [100] M.J. Andrés-Costa, N. Rubio-López, M. Morales-Suárez-Varela, Y. Picó, Environ. Pollut. 194 (2014) 152-162.
- [101] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, J. Martín-Alonso, F. Ventura, Sci.Total Environ. 397 (2008) 31-40.
- [102] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, Anal. Chem. 79 (2007) 3821-3829.
- [103] V. Yargeau, B. Taylor, H. Li, A. Rodayan, C.D. Metcalfe, Sci. Total Environ. 487 (2014) 722-730.
- [104] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, C. Chiabrando, P. Grassi, R. Fanelli, Water Res. 42 (2008) 961-968.
- [105] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 6809-6816.
- [106] A. Kaleta, M. Ferdig, W. Buchberger, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1662-1666.
- [107] T.L. Jones-Lepp, R. Stevens, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 1173-1183.
- [108] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7901-7913.
- [109] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, Water Res. 45 (2011) 1432-1442.
- [110] A. Wick, G. Fink, A. Joss, H. Siegrist, T.A. Ternes, Water Res. 43 (2009) 1060-1074.
- [111] M. Östman, J. Fick, E. Näsström, R.H. Lindberg, Sci.Total Environ. 472 (2014) 862-871.
- [112] S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4989-5000.
- [113] M.J. Martínez-Bueno, A. Agüera, M.J. Gómez, M.D. Hernando, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba, Anal. Chem. 79 (2007) 9372-9384.
- [114] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4212-4222.
- [115] S. Esteban, Y. Valcárcel, M. Catalá, M. Castromil González, Gac. Sanit. 26 (2012) 457-459.
- [116] M. Letzel, K. Weiss, W. Schüssler, M. Sengl, Chemosphere 81 (2010) 1416-1422.
- [117] A. Jelic, M. Gros, A. Ginebreda, R. Céspedes-Sánchez, F. Ventura, M. Petrović, D. Barceló, Water Res. 45 (2011) 1165-1176.

- [118] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 13321-13329.
- [119] K.H. Langford, M. Reid, K.V. Thomas, J. *Environ. Monitor.* 13 (2011) 2284-2291.
- [120] P. Guerra, M. Kim, A. Shah, M. Alaei, S.A. Smyth, *Sci. Total Environ.* 473-474 (2014) 235-243.
- [121] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello, *Sci. Total Environ.* 429 (2012) 123-155.
- [122] N. Gilart, R.M. Marcé, N. Fontanals, F. Borrull, *Talanta* 110 (2013) 196-201.
- [123] I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, J. *Chromatogr. A* 985 (2003) 265-274.
- [124] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27-39.
- [125] M.J. Gómez, M. Petrović, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 224-233.
- [126] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 31-39.
- [127] T. Kosjek, E. Heath, A. Krbavčič, *Environ. Int.* 31 (2005) 679-685.
- [128] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 225-234.
- [129] S. Zorita, B. Boyd, S. Jönsson, E. Yilmaz, C. Svensson, L. Mathiasson, S. Bergström, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 147-154.
- [130] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Water Res.* 42 (2008) 3498-3518.
- [131] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 70 (2006) 678-690.
- [132] S. Marchese, D. Perret, A. Gentili, R. Curini, F. Pastori, *Chromatographia* 58 (2003) 263-269.
- [133] A. Togola, H. Budzinski, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 150-158.
- [134] M.J. Hilton, K.V. Thomas, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 129-141.
- [135] R. Hu, Z. Yang, L. Zhang, *Talanta* 85 (2011) 1751-1759.
- [136] Z. Es'haghi, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 83-88.
- [137] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122-159.
- [138] O. A. H. Jones, N. Voulvoulis, J. N. Lester, *Ecotoxicity of pharmaceuticals*. en: M. Petrović, D. Barceló, (eds). *Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle..* Elsevier, Amsterdam (2007) pp. 387-424

- [139] K. van Alstyne, A. Nelson, J. Vyvyan, D. Cancilla, *Oecologia* 148 (2006) 304-311.
- [140] R.H. Crist, K. Oberholser, B. Wong, D.R. Crist, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1523-1526.
- [141] E.J. Rosi-Marshall, D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, A. Paspalof, J.L. Tank, *J. Hazard. Mater.* 282 (2015) 18-25.
- [142] I. Chet, Y. Henis, R. Mitchell, *J. Bacteriol.* 115 (1973) 1215-1218.
- [143] N.N. Al-Hebshi, A.K. Al-Sharabi, H.M. Shuga-Aldin, M. Al-Haroni, I. Ghandour, *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010) 564-569.
- [144] D. Guido, K. Schirmer, M. Bracale, F. Pomati, *Illicit drugs in the environment: implication for ecotoxicology*, en: S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli (eds.) *Illicit drugs in the environment*. Wiley, Hogemboom (2011), pp.253-264
- [145] M. Parolini, A. Binelli, *Sci. Total Environ.* 468-469 (2014) 68-76.
- [146] C.D. Kennedy, S.W. Houmes, K.L. Wyrick, S.M. Kammerzell, K. Lukowiak, B.A. Sorg, *J. Exp. Biol.* 213 (2010) 2055-2065.
- [147] R. Pal, M. Megharaj, K.P. Kirkbride, R. Naidu, *Sci. Total Environ.* 463-464 (2013) 1079-1092.
- [148] I. González-Mariño, I. Rodríguez, J.B. Quintana, R. Cela, *J. Hazard. Mater.* 261 (2013) 628-636.
- [149] T. Brodin, J. Fick, M. Jonsson, J. Klaminder, *Science* 339 (2013) 814-815.
- [150] V. Lorenzi, R. Choe, D. Schlenk, *Environment Toxicol.* (2014) 1-8.
- [151] B. Nunes, A.R. Gaio, F. Carvalho, L. Guilhermino, *Ecotox. Environ. Safe.* 71 (2008) 341-354.
- [152] Z. Bencan, D. Sledge, E.D. Levin, *Pharmacol. Biochem Behav.* 94 (2009) 75-80.
- [153] D.L. Gebauer, N. Pagnussat, Â.L. Piato, I.C. Schaefer, C.D. Bonan, D.R. Lara, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (2011) 480-486.
- [154] H. Richendrfer, S.D. Pelkowski, R.M. Colwill, R. Creton, *Behav. Brain Res.* 228 (2012) 99-106.
- [155] P.J. Steenbergen, M.K. Richardson, D.L. Champagne, *Behav. Brain Res.* 222 (2011) 15-25.
- [156] D.M. Oggier, C.J. Weisbrod, A.M. Stoller, A.K. Zenker, K. Fent, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7685-7691.
- [157] V. Calisto, V.I. Esteves, *Chemosphere* 77 (2009) 1257-1274.

- [158] B. Nunes, F. Carvalho, L. Guilhermino, *Chemosphere* 62 (2006) 581-594.
- [159] F. Pomati, S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli, D. Vigetti, C. Rossetti, D. Calamari, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2442-2447.
- [160] M. Cleuvers, *Ecotox. Environ. Safe.* 59 (2004) 309-315.
- [161] M. Parolini, A. Binelli, *Ecotoxicol.* 21 (2012) 379-392.
- [162] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Lex* L226, 24/08/2013.
- [163] J. Schwaiger, H. Ferling, U. Mallow, H. Wintermayr, R.D. Negele, *Aquat. Toxicol.* 68 (2004) 141-150.
- [164] R. Triebskorn, H. Casper, A. Heyd, R. Eikemper, H.R. Kohler, J. Schwaiger, *Aquat. Toxicol.* 68 (2004) 151-166.
- [165] M. Parolini, A. Binelli, A. Provini, *Water, Air, Soil Pollut.* 217 (2011) 589-601.
- [166] N. Laville, S. Ait-Aissa, E. Gomez, C. Casellas, J.M. Porcher, *Toxicology* 196 (2004) 41-55.
- [167] A.V. Hallare, H.R. Kohler, R. Triebskorn, *Chemosphere* 56 (2004) 659-666.
- [168] K. Ji, X. Liu, S. Lee, S. Kang, Y. Kho, J.P. Giesy, K. Choi, *J. Hazard. Mater.* 254-255 (2013) 242-251.
- [169] J.E. Morthorst, A. Lister, P. Bjerregaard, G.V. Der Kraak, *Comp. Biochem. Phys. C* 157 (2013) 251-257.
- [170] J.L. Oaks, M. Gilbert, M.Z. Virani, R.T. Watson, C.U. Meteyer, B.A. Rideout, H.L. Shivaprasad, S. Ahmed, M.J. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A.A. Khan, *Nature* 427 (2004) 630-633.
- [171] M.S. Diniz, R. Salgado, V.J. Pereira, G. Carvalho, A. Oehmen, M.A.M. Reis, J.P. Noronha, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 282-289.
- [172] R. Cela, R. A. Lorenzo, M. C. Casais, *Técnicas de separación en Química Analítica, Síntesis*, Madrid (2002)
- [173] A. Skoog Douglas, F. Holler James, A. Nieman Timothy. *Principios de análisis instrumental*. (5ª ed). Mc Graw-Hill/Interamericana, Madrid (2001).
- [174] F. Orata, *Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis*. en: M.A. Mohd (ed). *Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, InTech, Rikeja (2012) pp. 83-108.

- [175] D.L. Lin, S.M. Wang, C.H. Wu, B.G. Chen, R.H. Lu, *J. Food Drug Anal.* 16 (2008) 1-10.
- [176] J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 61-90.
- [177] E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, P. Navarro, M. Olivares, A. Prieto, A. Vallejo, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1296 (2013) 36-46.
- [178] J.L. Little, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 1-22.
- [179] R.J. Wells, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 1-18.
- [180] P. Husek, P. Simek, *Curr. Pharm. Anal.* 2 (2006) 23-43.
- [181] A.M. Casas-Ferreira, M.E. Fernández-Laespada, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, *J. Chromatogr. A* 1296 (2013) 70-83.
- [182] E. Villaverde-de-Sáa, I. González-Mariño, J.B. Quintana, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2559-2568.
- [183] I. Citová, R. Sladkovský, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 231-241.
- [184] W.M.A. Niessen. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. (2^a ed). Marcel Dekker Inc. New York (1999).
- [185] M.J. Martínez-Bueno, S. Ucles, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Talanta* 85 (2011) 157-166.
- [186] A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 819-828.
- [187] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Rodil, J. González-Peñas, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8435-8441.
- [188] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, *Anal. Chim. Acta* 768 (2013) 102-110.
- [189] N.V. Heuett, C.E. Ramírez, A. Fernández, P.R. Gardinali, *Sci. Total Environ.* 511 (2015) 319-330.
- [190] F. Hernández, L. Bijlsma, J.V. Sancho, R. Díaz, M. Ibáñez, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 96-106.
- [191] N.V. Heuett, S.R. Batchu, P.R. Gardinali, *J. Hazard. Mater.* 282 (2015) 41-50.

- [192] J. Bones, K.V. Thomas, B. Paull, J. Environ. Monit. 9 (2007) 701-707.
- [193] D.B. Robb, M.W. Blades, Anal. Chim. Acta 627 (2008) 34-49.
- [194] A. Miki, M. Katagi, K. Zaitzu, H. Nishioka, H. Tsuchihashi, J. Chromatogr. B 865 (2008) 25-32.
- [195] S. Strano-Rossi, F. Molaioni, F. Rossi, F. Botre, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 1529-1535.
- [196] M. Pujadas, S. Pichini, E. Civit, E. Santamarina, K. Perez, R. de La Torre, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 594-601.
- [197] T. Nadulski, F. Sporkert, M. Schnelle, A.M. Stadelmann, P. Roser, T. Schefter, F. Pragst, J. Anal. Toxicol. 29 (2005) 782-789.
- [198] T. Gunnar, K. Ariniemi, P. Lillsunde, J. Mass Spectrom. 40 (2005) 739-753.
- [199] M. Yonamine, N. Tawil, R.L.d.M. Moreau, O.A. Silva, J. Chromatogr. B 789 (2003) 73-78.
- [200] S.D. Brown, D.J. Rhodes, B.J. Pritchard, Forensic Sci. Int. 171 (2007) 142-150.
- [201] H.G. Uglund, M. Krogh, K.E. Rasmussen, J. Chromatogr. B 701 (1997) 29-38.
- [202] R. Meatherall, J. Anal. Toxicol. 19 (1995) 316-322.
- [203] T. Gunnar, S. Mykkanen, K. Ariniemi, P. Lillsunde, J. Chromatogr. B 806 (2004) 205-219.
- [204] K.J. Chia, S.D. Huang, Anal. Chim. Acta 539 (2005) 49-54.
- [205] C. Jurado, M.P. Giménez, T. Soriano, M. Menéndez, M. Repetto, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 11-16.
- [206] D.Z. Souza, P.O. Boehl, E. Comiran, K.C. Mariotti, F. Pechansky, P.C.A.V. Duarte, R. de Boni, P.E. Froehlich, R.P. Limberger, Anal. Chim. Acta 696 (2011) 67-76.
- [207] H. Sachs, P. Kintz, J. Chromatogr. B 713 (1998) 147-161.
- [208] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, J. Chromatogr. Sci. 51 (2013) 587-598.
- [209] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Anal. Chem. 81 (2009) 898-912.

- [210] C. Repice, M.D. Grande, R. Maggi, R. Pedrazzani, *Sci. Total Environ.* 463-464 (2013) 27-34.
- [211] R. Grabic, J. Fick, R.H. Lindberg, G. Fedorova, M. Tysklind, *Talanta* 100 (2012) 183-195.
- [212] M.A. Sousa, C. Gonçalves, E. Cunha, J. Hajšlová, M.F. Alpendurada, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 807-822.
- [213] J.B. Quintana, T. Reemtsma, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 765-774.
- [214] T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 477-501.
- [215] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6265-6274.
- [216] M. Stueber, T. Reemtsma, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 910-916.
- [217] M. Farré, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1203-1214.
- [218] X.S. Miao, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 139-147.
- [219] Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off J Eur Lex* L067, 17/08/2008 p.8-36
- [220] Z. Yu, S. Peldszus, P.M. Huck, *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 65-77.
- [221] I. Rodríguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 1-8.
- [222] L. Araujo, J. Wild, N. Villa, N. Camargo, D. Cubillan, A. Prieto, *Talanta* 75 (2008) 111-115.
- [223] L. Xu, M. Jiang, G. Li, *Anal. Chim. Acta* 666 (2010) 45-50.
- [224] C. Zwiener, T. Glauner, F.H. Frimmel, *J. High Res. Chromatogr.* 23 (2000) 474-478.
- [225] J.J. Jiménez, *Talanta* 116 (2013) 678-687.
- [226] V. Koutsouba, T. Heberer, B. Fuhrmann, K. Schmidt-Baumler, D. Tsipi, A. Hiskia, *Chemosphere* 51 (2003) 69-75.
- [227] G. Grueiro-Noche, M.E. Fernández-Laespada, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, S. Muniategui-Lorenzo, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9390-9396.

- [228] M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, J. Chromatogr. A 873 (2000) 95-106.
- [229] P.M. Thomas, G.D. Foster, J. Environ. Sci. Health. A 39 (2004) 1969-1978.
- [230] T.A. Ternes, M. Meisenheimer, D. Mcdowell, F. Sacher, H.J. Brauch, B. Haist-Gulde, G. Preuss, U. Wilme, N. Zulei-Seibert, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 3855-3863.
- [231] Á. Sebők, A. Vasanits-Zsigrai, G. Palkó, G. Záray, I. Molnár-Perl, Talanta 76 (2008) 642-650.
- [232] C. Schummer, O. Delhomme, B.M.R. Appenzeller, R. Wennig, M. Millet, Talanta 77 (2009) 1473-1482.
- [233] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, E. Martínez, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, Anal. Chim. Acta 524 (2004) 63-71.
- [234] F. Sacher, F.T. Lange, H.-J. Brauch, I. Blankenhorn, J. Chromatogr. A 938 (2001) 199-210.
- [235] N. Migowska, P. Stepnowski, M. Paszkiewicz, M. Gołębiowski, J. Kumirska, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 3029-3034.
- [236] R. Kanda, P. Griffin, H.A. James, J. Fothergill, J. Environ. Monit. 5 (2003) 823-830.
- [237] J.L. Pérez-Pavón, A.M. Casas-Ferreira, M.E. Fernández-Laespada, B. Moreno-Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6728-6734.
- [238] C.D. Metcalfe, X.S. Miao, B.G. Koenig, J. Struger, Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 2881-2889.
- [239] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8036-8059.
- [240] B. Buszewski, M. Szultka, Crit. Rev. Anal. Chem. 42 (2012) 198-213.
- [241] K.M. Li, L.P. Rivory, S.J. Clarke, Curr. Pharm. Anal. 2 (2006) 95-102.
- [242] V. Pichon, J. Chromatogr. A 885 (2000) 195-215.
- [243] K. Pyrzynska, E. Pobozy, Crit. Rev. Anal. Chem. 32 (2002) 227-243.
- [244] Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. December 2007 Method 1694. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC (2007).

- [245] ISO 15913: Water Quality: Determination of selected phenoxyalkanoic herbicides, including bentazones and hydroxybenzonitriles by gas chromatography and mass spectrometry after solid phase extraction and derivatization. International Organization for Standardization, Geneve (2000)
- [246] E.M Thurman, M.S Mills (Eds.) Solid-phase Extraction. Principles and Practice. John Wiley & Sons, New York (1998)
- [247] M.C. Hennion, J. Chromatogr. A 856 (1999) 3-54.
- [248] C.F. Poole, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 362-373.
- [249] L. Chen, H. Wang, Q. Zeng, Y. Xu, L. Sun, H. Xu, L. Ding, J. Chromatogr. Sci. 47 (2009) 614-623.
- [250] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, Cromatogr. y Tec. Afines 31 (2010) 3-27.
- [251] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 394-406.
- [252] C.W. Huck, G.K. Bonn, J. Chromatogr. A 885 (2000) 51-72.
- [253] Oasis sample extraction products, technical guide, Waters. Disponible en :http://www.waters.com/waters/en_US/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&&locale=en_US. Último acceso: enero 2015
- [254] I. Senta, I. Krizman, M. Ahel, S. Terzic, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 3255-3268.
- [255] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, J. Sep. Sci. 31 (2008) 2358-2370.
- [256] A. Beltrán, F. Borrull, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 1363-1375.
- [257] A. Maruska, O. Kornysova, J. Chromatogr. A 1112 (2006) 319-330.
- [258] E.G. Vlakh, T.B. Tennikova, J. Sep. Sci. 30 (2007) 2801-2813.
- [259] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Frechet, Chem. Mater. 10 (1998) 4072-4078.
- [260] Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou, Anal. Chem. 75 (2003) 2517-2521.
- [261] I. Marchi, J. Schappler, J.-L. Veuthey, S. Rudaz, J. Chromatogr. B 877 (2009) 2275-2283.
- [262] E. Cudjoe, J. Pawliszyn, J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (2009) 556-562.

- [263] O.H. Drummer, J. Chromatogr. B 713 (1998) 201-225.
- [264] M.M. Ariffin, E.I. Miller, P.A.G. Cormack, R.A. Anderson, Anal. Chem. 79 (2007) 256-262.
- [265] R.A. Anderson, M.M. Ariffin, P.A.G. Cormack, E.I. Miller, Forensic Sci. Int. 174 (2008) 40-46.
- [266] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1248 (2012) 104-121.
- [267] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, Environ. Int. 37 (2011) 49-55.
- [268] M.J. Gómez, A. Agüera, M. Mezcua, J. Hurtado, F. Mocholí, A.R. Fernández-Alba, Talanta 73 (2007) 314-320.
- [269] A. Azzouz, B. Souhail, E. Ballesteros, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2956-2963.
- [270] A. Helenkár, Á. Sebők, G. Záray, I. Molnár-Perl, A. Vasanits-Zsigrai, Talanta 82 (2010) 600-607.
- [271] S. Weigel, R. Kallenborn, H. Huhnerfuss, J. Chromatogr. A 1023 (2004) 183-195.
- [272] M. Caban, K. Mioduszevska, P. Łukaszewicz, N. Migowska, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Kumirska, J. Chromatogr. A 1346 (2014) 107-116.
- [273] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 1293-1308.
- [274] A. Togola, H. Budzinski, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 627-635.
- [275] N. Gilart, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, J. Sep. Sci. 35 (2012) 875-882.
- [276] P.T. Anastasas, J.C. Warner, Green Chemistry. Theory and Practice, Oxford University Press, New York (1998)
- [277] J.B. Quintana, M. Ramil, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela; New Sample Preparation Strategies for Analytical Determinations. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, New York (2014).
- [278] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Anal. Methods 3 (2011) 1719-1728.
- [279] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145-2148.

- [280] J. Pawliszyn. Solid Phase Microextraction, theory and practice. Wiley-VCH, New York, 1997.
- [281] J. Pawliszyn, Applications of Solid Phase Microextraction, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999)
- [282] R. Eisert, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 3140-3147.
- [283] H. Kataoka, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 31-45.
- [284] Y. Gou, C. Tragas, H. Lord, J. Pawliszyn, J. Microcol. Sep. 12 (2000) 125-134.
- [285] E. González-Toledo, M.D. Prat, M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A 923 (2001) 45-52.
- [286] A. Aresta, F. Palmisano, C.G. Zambonin, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 643-647.
- [287] H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 902 (2000) 17-63.
- [288] E.E. Stashenko, J.R. Martínez, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 553-561.
- [289] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 64 (1992) 1187-1199.
- [290] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 65 (1993) 1843-1852.
- [291] J. Ai, Anal. Chem. 69 (1997) 1230-1236.
- [292] B. Zygmunt, A. Jastrzebska, J. Namiesnik, Crit. Rev. Anal. Chem. 31 (2001) 1-18.
- [293] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H.G. Janssen, C. Cramers, Anal. Chem. 71 (1999) 5213-5216.
- [294] B.J. Hall, M. Satterfield-Doerr, A.R. Parikh, J.S. Brodbelt, Anal. Chem. 70 (1998) 1788-1796.
- [295] C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, Anal. Biochem. 333 (2004) 328-335.
- [296] G. Theodoridis, E.H.M. Koster, G.J. De Jong, J. Chromatogr. B 745 (2000) 49-82.
- [297] N.H. Snow, J. Chromatogr. A 885 (2000) 445-455.
- [298] F. Pragst, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1393-1414.

- [299] N. Unceta, M.C. Sampedro, N.K.A. Bakar, A. Gómez-Caballero, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3392-3399.
- [300] E.A. Suchara, D. Budziak, E. Martendal, L.L.F. Costa, E. Carasek, Anal. Chim. Acta 613 (2008) 169-176.
- [301] O.P. Togunde, E. Cudjoe, K.D. Oakes, F.S. Mirnaghi, M.R. Servos, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 1262 (2012) 34-42.
- [302] P.C.F.d.L. Gomes, J.Y. Barletta, C.E.D. Nazario, A.J. Santos-Neto, M.A. von Wolff, C.M.R. Coneglian, G.A. Umbuzeiro, F.M. Lancas, J. Sep. Sci. 34 (2011) 436-445.
- [303] G. Basaglia, M. Pietrogrande, Chromatographia 75 (2012) 361-370.
- [304] N. Huppert, M. Wuertele, H.H. Hahn, J. Anal. Chem. 362 (1998) 529-536.
- [305] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 737-747.
- [306] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2642-2666.
- [307] F. David, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 54-69.
- [308] F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, P. Grossi, I.R.B. Olivares, J. Sep. Sci. 32 (2009) 813-824.
- [309] F.J. Camino-Sánchez, R. Rodríguez-Gómez, A. Zafra-Gómez, A. Santos-Fandila, J.L. Vélchez, Talanta 130 (2014) 388-399.
- [310] Stir-Bar Sorptive Extraction, Gerstel. Disponible en:
<http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>. Último acceso: septiembre 2014
- [311] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, Anal. Chim. Acta 774 (2013) 51-60.
- [312] B. Sgorbini, C. Cagliero, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, M.R. Ruosi, C. Bicchi, J. Chromatogr. A 1265 (2012) 39-45.
- [313] M. He, B. Chen, B. Hu, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 2001-2026.
- [314] Thermal Desorption Unit, Gerstel: Disponible en :
<http://www.gerstel.com/en/thermal-desorption-unit.htm>. Último acceso: septiembre 2014

- [315] J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta* 757 (2012) 1-10.
- [316] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, J. *Pharmaceut. Biomed.* 40 (2006) 500-508.
- [317] E. van Hoeck, F. Canale, C. Cordero, S. Compernelle, C. Bicchi, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 907-919.
- [318] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 10-16.
- [319] M. van Pinxteren, A. Paschke, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2589-2598.
- [320] M.I. Carpinteiro, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2825-2831.
- [321] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollaín, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 84-91.
- [322] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 41-47.
- [323] M. van Pinxteren, L. Montero, S. Jäsch, H. Paschke, P. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 767-775.
- [324] N. Negreira, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 603-611.
- [325] C. Valls-Cantenys, E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, M. Iglesias, V. Salvadó, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 770 (2013) 85-93.
- [326] M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 175-183.
- [327] L. Montero, P. Popp, A. Paschke, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 17-26.
- [328] A. Paschke, J. Brümmer, G. Schüürmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1417-1421.
- [329] W. Zhao, G. Ouyang, M. Alaei, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 112-120.
- [330] T.P. Rusina, F. Smedes, J. Klanova, K. Booij, I. Holoubek, *Chemosphere* 68 (2007) 1344-1351.
- [331] P. Popp, C. Bauer, A. Paschke, L. Montero, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 307-312.

- [332] S. Triñanes, M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, *Talanta* 132 (2015) 433-442.
- [333] E. Villaverde-de-Sáa, I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 740 (2012) 50-57.
- [334] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, M. Möder, *Anal. Chim. Acta* 716 (2012) 119-127.
- [335] J. Casado, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1299 (2013) 40-47.
- [336] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, M. Möder, I. Rodríguez, *Talanta* 122 (2014) 264-271.
- [337] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1-10.
- [338] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 132-142.
- [339] S. Müller, M. Moeder, S. Schrader, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 99-106.
- [340] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, M. Ramil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1198-1199 (2008) 21-26.
- [341] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (FPSE), US Patent Application US14/216,121, March 17, 2014.
- [342] A. Kabir, K.G. Furton, A. Malik, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 197-218.
- [343] A. Kabir, C. Hamlet, A. Malik, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 1-13.
- [344] K. Rajesh, Gaurav, Heena, A.K. Malik, K. Abuzar, K.G. Furton, *J. Chromatogr. A* 1359 (2014) 16-25.
- [345] V. Samanidou, L.D. Galanopoulos, A. Kabir, K.G. Furton, *Anal. Chim. Acta* 855 (2015) 41-50.
- [346] M. Roldán-Pijuán, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, A. Kabir, K.G. Furton, *J. Chromatogr. A* 1376 (2015) 35-45.



Tabla II.1.	Estructura y principales propiedades fisicoquímicas de los cannabinoides a estudiar.	30
Tabla II.2.	Estructura y principales propiedades fisicoquímicas de los ATS recogidos en esta Tesis.	34
Tabla II.3.	Principales biomarcadores empleados para las drogas de abuso detectadas en agua y factores de corrección usados en los estudios epidemiológicos a través del estudio de aguas residuales.	39
Tabla II.4.	Estructura química de las benzodiazepinas y compuestos relacionados estudiados en esta Tesis.	45
Tabla II.5.	Propiedades fisicoquímicas de las BZPs estudiadas, ZOLP y MPHEN.	47
Tabla II.6.	Recopilación de datos metabólicos y porcentajes de excreción para las BZPs y compuestos relacionados estudiados en esta Tesis.	49
Tabla II.7.	Estructura y principales propiedades fisicoquímicas de los NSAIDs estudiados en esta Tesis.	55
Tabla II.8.	Rango de concentraciones (mínimo-máximo, ng L ⁻¹) de drogas de abuso detectadas en influente.	60
Tabla II.9.	Rango de concentraciones (mínimo-máximo, ng L ⁻¹) detectados en influente, efluente y agua superficial para las BZPs y compuestos relacionados estudiados en esta Tesis.	63
Tabla II.10.	Rango de concentraciones de los NSAIDs considerados en esta Tesis (mínimo-máximo, en µg L ⁻¹) en diferentes aguas superficiales.	68
Tabla II.11.	Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para el análisis de cannabinoides y ATS en muestras acuosas empleando LC-(ESI+)-MS/MS como método de determinación.	83
Tabla II.12.	Resumen de las condiciones de derivatización empleadas en la bibliografía para la determinación de cannabinoides y ATS en muestras líquidas de origen biológico empleando GC-MS como método de determinación.	86
Tabla II.13.	Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para el análisis de BZPs y compuestos relacionados usando LC-MS/MS como método de determinación.	88
Tabla II.14.	Resumen de las condiciones de derivatización empleadas en la bibliografía para la determinación de NSAIDs en muestras ambientales empleando GC-MS como técnica de determinación.	90
Tabla II.15.	Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para la determinación de cannabinoides y ATS en matrices acuosas empleando SPE.	107

Tabla II.16. Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para la determinación de BZPs y compuestos relacionados en matrices acuosas empleando SPE.	111
Tabla II.17. Resumen de los métodos de determinación empleados en la bibliografía para la extracción de NSAIDs en matrices acuosas y determinación mediante SPE-GC-MS.	113
Tabla II.18. Tipos de recubrimientos para fibras de SPME para fibras disponibles en la actualidad y principales recomendaciones de uso según el fabricante.	118
Tabla II.19. Tipos y características de los recubrimientos de las fibras de SPME disponibles en la actualidad.	126
Tabla II.20. Resumen de los principales métodos recogidos en la bibliografía que analizan NSAIDs, BZPs y compuestos relacionados en muestras acuosas mediante SPME y MS/(MS).	133



Figura II.1.	Flujo de trabajo empleado en los estudios epidemiológicos a través del análisis de agua residual.	38
Figura II.2.	Clasificación de los fármacos estudiados en esta Tesis según el sistema ATC.	42
Figura II.3.	Consumo de ansiolíticos e hipnótico-sedantes en España calculado a partir de las unidades vendidas.	51
Figura II.4.	Desglose por principio activo del total de ansiolíticos e hipnótico-sedantes prescritos en 2012.	52
Figura II.5.	Consumo de NSAIDs durante el período 2000-20012 en España.	57
Figura II.6.	Desglose por principio activo del consumo de arilpropiónicos y arilacéticos en 2012.	58
Figura II.7.	Concentración de los NSAIDs estudiados en esta Tesis en influente y en efluente.	67
Figura II.8.	Reacción genérica de derivatización de los reactivos sililantes que se han empleado en esta Tesis.	78
Figura II.9.	Reacción genérica de derivatización de isobutilcloroformiato y aminas que se ha empleado en esta Tesis.	80
Figura II.10.	Imagen de un detector de triple cuadrupolo (QqQ) y sus partes más importantes.	82
Figura II.11.	Clasificación de las técnicas de extracción más relevantes para muestras líquidas en función de la cantidad de analito que pueden extraer de la matriz.	94
Figura II.12.	Etapas en la extracción mediante SPE.	98
Figura II.13.	Estructura de la fase Oasis HLB y los polímeros de modo mixto creados a partir de él.	102
Figura II.14.	Retención de los analitos según el pH empleado y el tipo de fase polimérica.	104
Figura II.15.	Diferentes dispositivos empleados para llevar a cabo la SPE.	105
Figura II.16.	Etapas en las técnicas de extracción no exhaustivas y los principales factores que influyen en cada una de ellas.	115
Figura II.17.	Detalle del montaje de la fibra de SPME: detalle del interior y partes diferenciadas de la aguja	117
Figura II.18.	Esquema del acoplamiento <i>in-tube</i> SPME a un LC.	118

Figura II.19. Diferentes tipos de muestreo en SPME según la posición de la fibra.	119
Figura II.20. Diferentes modos de desorción de las fibras de SPME.	120
Figura II.21. Esquema de las partes de un Twister.	134
Figura II.22. Eficacia de extracción teórica en función del volumen de fase empleado y la K_{fs} .	137
Figura II.23. Diferentes formatos de materiales ab/adsorbentes.	139
Figura II.24. Estructura de los principales polímeros porosos utilizados como ab/adsorbentes.	139
Figura II.25. Esquema de FPSE empleando PTHF y un soporte sólido de celulosa.	143
Figura II.26. Aspecto de la FPSE previo a la extracción y durante la extracción.	144





III. METODOLOGÍA DESARROLLADA



En este capítulo se describe la metodología analítica utilizada en el desarrollo de esta Tesis así como las publicaciones científicas originadas de este trabajo. El trabajo realizado se engloba dentro de la aplicación de ab/adsorbentes sólidos para la extracción de muestras acuosas que contienen compuestos de alto interés medioambiental usando tanto técnicas de extracción exhaustivas (SPE) como no exhaustivas (SPME, polímeros ab/adsorbentes y FPSE).

El empleo de técnicas que minimizan el consumo de disolventes orgánicos está cada vez más presente en los métodos analíticos puesto que la generación de residuos y en particular, los que proceden de disolventes orgánicos han originado cada vez más preocupación dentro del ámbito medioambiental [1]. En esta Tesis se ha querido destacar la posibilidad de utilizar técnicas de extracción no exhaustivas, en las que el uso de disolventes es muy bajo o incluso nulo, a un amplio grupo de compuestos: drogas de abuso (cannabinoides y ATS), benzodiacepinas y compuestos relacionados y NSAIDs. El trabajo realizado ha permitido publicar cinco artículos en revistas de reconocido prestigio en el ámbito analítico ofreciendo una clara alternativa a las técnicas que se venían aplicando hasta el momento.

A. DROGAS DE ABUSO

En primer lugar se ha aplicado la SPME a la extracción de dos familias de drogas de abuso, por una parte los cannabinoides y por otra, las anfetaminas y derivados del éxtasis. En la primera de las aplicaciones se planteó desarrollar una metodología alternativa a la determinación de THC y THCCOOH mediante SPE y LC-MS(/MS). El propósito era minimizar el volumen de muestra y disolvente y conseguir unos LOQs que permitiesen su cuantificación fiable en muestras acuosas ya que su baja ionización cuando se emplea ESI (especialmente para el derivado carboxilado) hace que muchas veces estos compuestos no sean incluidos en métodos multianalito [2-5]. En este primer trabajo se desarrolló una extracción con una fibra de SPME de recubrimiento triple (CAR/PDMS/DVB) usando solamente 10 mL de muestra y determinación por GC-MS. La

derivatización se llevó a cabo de forma *offline* exponiendo la fibra a los vapores de MSTFA. De forma gráfica se muestra en la figura III.1 la metodología desarrollada.

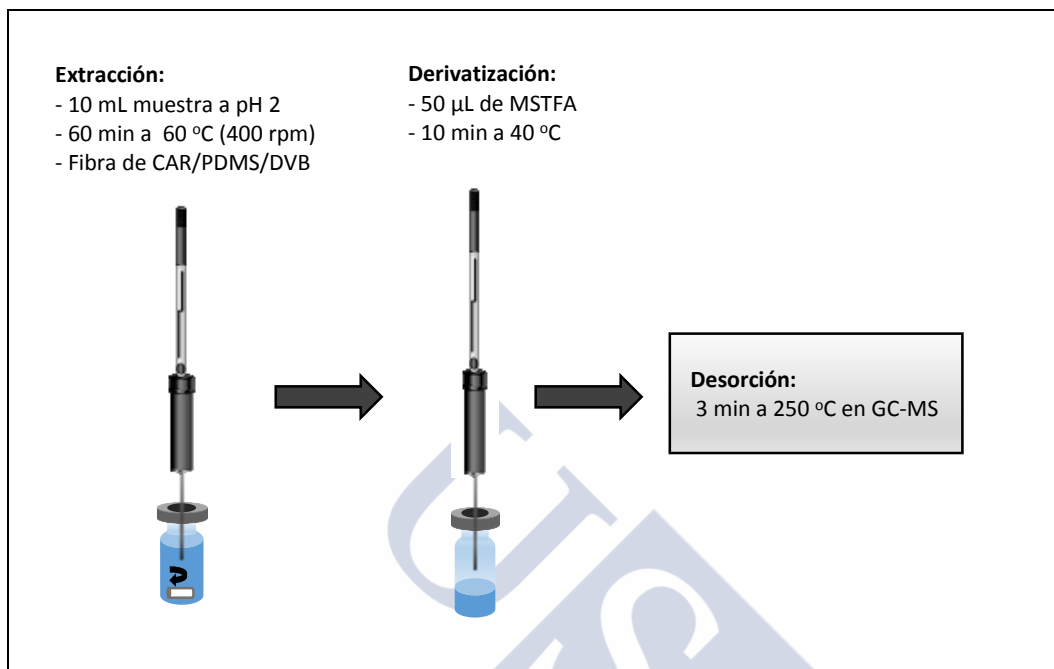


Figura III.1. Metodología desarrollada para la extracción de THC y THCCOOH en muestras acuosas.

Por otra parte las anfetaminas, éxtasis y sus derivados, son consideradas drogas de abuso de carácter básico por lo que ha sido necesario desarrollar una metodología ligeramente diferente a la seleccionada para los cannabinoides (figura III.2), con el objetivo de conseguir su determinación a niveles de concentración lo suficientemente bajos para poder detectarlas en aguas residuales y superficiales. En este caso ha sido posible abordar una derivatización en la muestra usando para ello iBCF. Por su simplicidad operacional y robustez la determinación se realizó de nuevo empleando un GC-MS. El método propuesto fue validado también en muestras de orina.

B. FÁRMACOS

Hasta el momento de publicación de esta Tesis la presencia de BZPs en muestras acuosas había sido estudiada en muy pocos casos, siempre centrados en la determinación de pocos compuestos (entre 5 y 8 analitos) [2, 6-10], mientras que zolpidem y metilfenidato habían sido monitorizados en menor número [7-9].

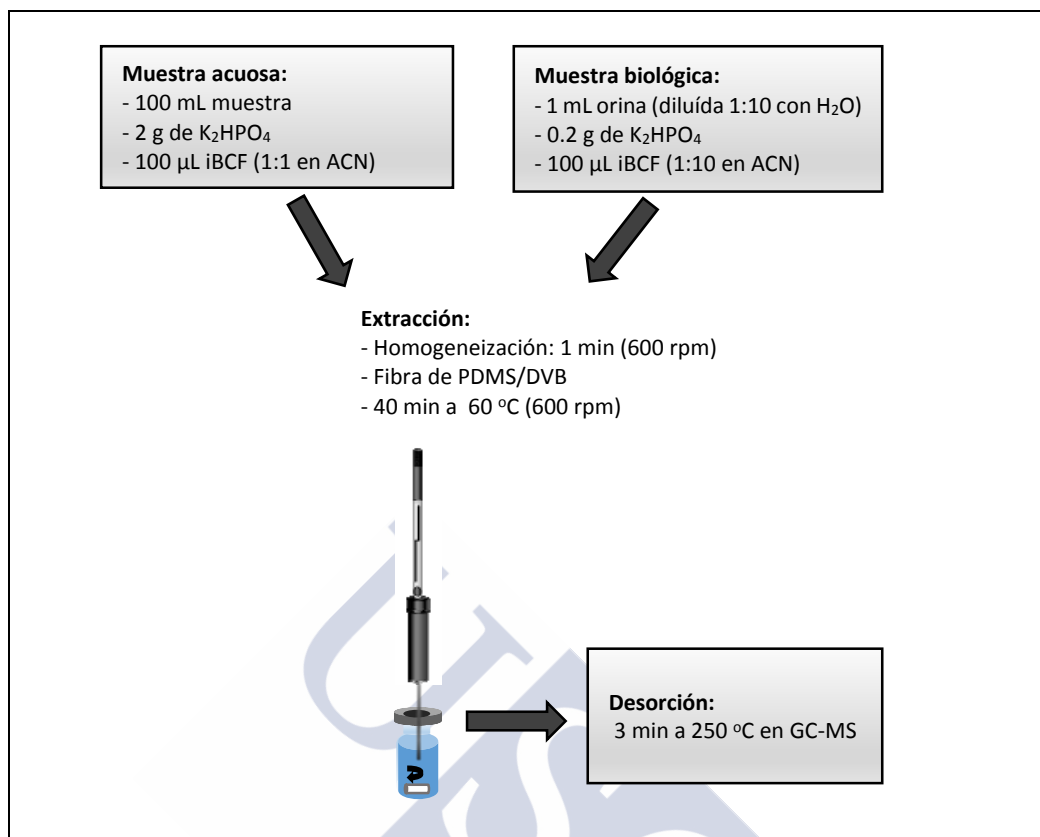


Figura III.2. Metodología desarrollada para la extracción de cinco ATS en muestras acuosas. ACN: acetonitrilo

El análisis de estos compuestos ha estado englobado dentro de métodos multianalito junto con otros fármacos y/o drogas de abuso por lo que no existía una metodología específica para esta familia. Además, existen diferentes estudios que ponen de manifiesto el incremento en el consumo de ansiolíticos e hipnótico-sedantes en los últimos años en España con lo que es de esperar que su presencia en el medioambiente sea relevante [11, 12].

En primer lugar se decidió aplicar como técnica de referencia la SPE a un amplio grupo de fármacos como son las benzodiazepinas, zolpidem, metilfenidato y sus principales metabolitos humanos (un total de 23 analitos) en aguas residuales y superficiales y que se representa de forma esquemática en la figura III.3. La determinación se llevó a cabo a través de LC-MS/MS ya que el uso de GC-MS, a pesar de ser más sencillo y de haberse utilizado en esta Tesis para otras sustancias, hacía necesario una reacción de derivatización. Esto se traducía en una baja sensibilidad que unida a la degradación

térmica de alguno de los compuestos hacía inviable su determinación [13, 14]. En el desarrollo del método se probaron diferentes cartuchos poliméricos, resultando ser los Oasis MCX los que producían mejores resultados. Se evaluaron además factores como el pH, la adsorción sobre el material filtrante y la estabilidad de los compuestos en agua residual. Como novedad, se aplicó el factor de concentración efectivo (ECF) para determinar el mejor volumen final de los extractos en muestras en las que la matriz ejerce un peso importante.

Con este trabajo se ha detectado por primera vez la presencia de algunas BZPs en aguas residuales y superficiales en España (RIT y TEM) y se han aportado más datos sobre la presencia en Europa de estos fármacos susceptibles de un potencial uso abusivo e ilícito en Europa.

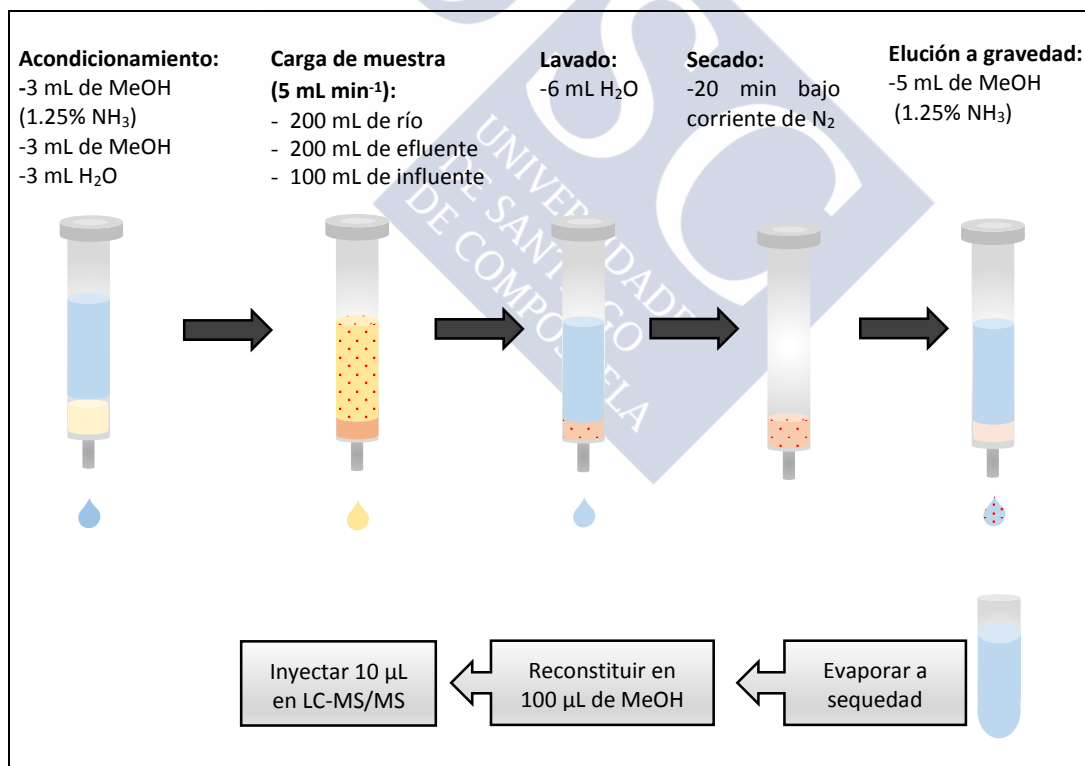


Figura III.3. Metodología desarrollada para la determinación de BZPs y analitos relacionados en aguas medioambientales usando SPE-LC-MS/MS.

El uso de dispositivos poliméricos como extractantes de soporte sólido no ha sido muy empleado en la extracción de compuestos polares pese a ser dispositivos con una

gran capacidad de fase y que su bajo precio permite desecharlos tras su uso [15, 16]. En esta Tesis se planteó el uso de fibras de polipropileno como material para la extracción de BZPs y zolpidem en diferentes matrices acuosas (agua residual y superficial). La metodología de trabajo (figura III.4) permitió obtener LOQs muy bajos y presentarla como una alternativa más simple y barata que la SPE previamente desarrollada. El tiempo necesario para llegar al equilibrio puede ser elevado (dependiendo de los analitos y de la cantidad de muestra). Sin embargo, se compensa con la posibilidad de llevar a cabo múltiples extracciones con una mínima instrumentación y con escasa vigilancia por parte del operario.

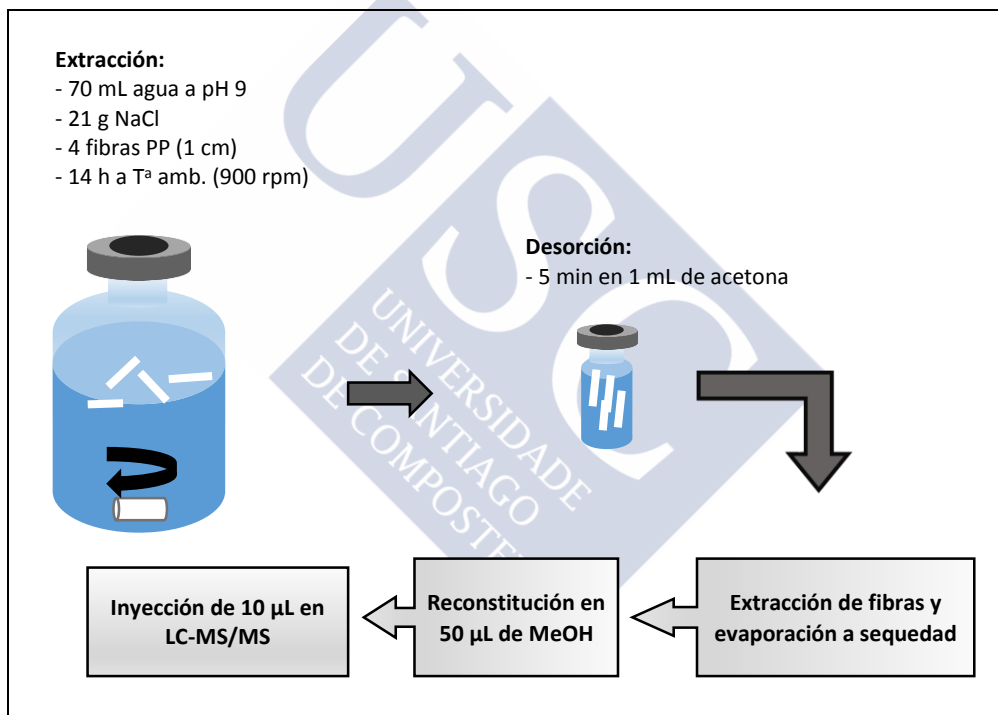


Figura III.4. Metodología desarrollada para la extracción de BZPs usando polímeros en muestras acuosas. Tª amb: temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$).

Finalmente, se incluye una colaboración con la Universidad Internacional de Florida para validar un nuevo material de extracción. Se trata de la técnica descrita como FPSE en la que se utilizan polímeros orgánicos modificados a través de una reacción "sol-gel" que permite obtener materiales con una alta capacidad de fase [17]. En este caso la FPSE ha sido aplicada a NSAIDs, analitos para los cuales existen metodologías de extracción no exhaustivas basadas en la ab/adsorción sobre soporte sólido con los que se

podría llevar a cabo una comparación del procedimiento. El uso de FPSE permitió llegar al equilibrio en un período de tiempo muy corto (45-100 min) utilizando muy poco volumen de muestra (30 mL) y obteniendo unos LOQs en el rango de 0.8-15 ng L⁻¹ menores que los obtenidos con otras metodologías y sin sufrir efectos de matriz. En la figura III.5 se describe de forma esquemática el procedimiento desarrollado.

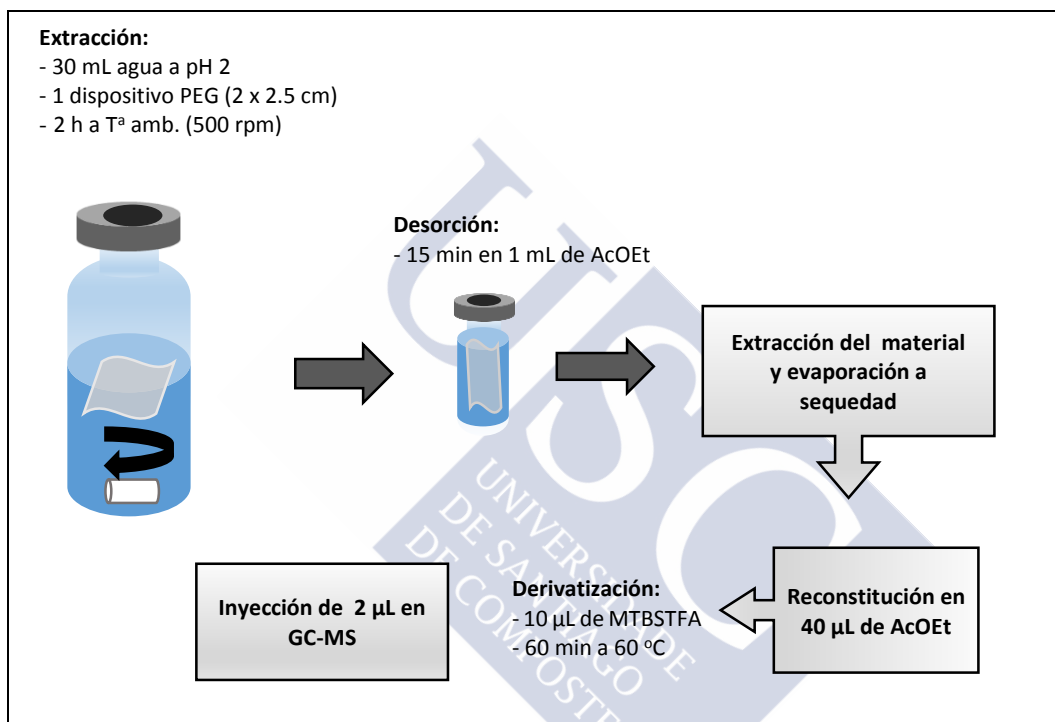


Figura III.5. Metodología desarrollada para la extracción de NSAIDs empleando FPSE. AcOEt: Acetato de etilo. T^a amb: temperatura ambiente (20 ± 1 °C).

REFERENCIAS

- [1] P.T. Anastasas, J.C. Warner, *Green Chemistry. Theory and Practice*, Oxford University Press, New York (1998)
- [2] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1620-1631.
- [3] A.C. Chiaia, C. Banta-Green, J. Field, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8841-8848.
- [4] M.J. Martínez Bueno, S. Ucles, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Talanta* 85 (2011) 157-166.
- [5] J. Bones, K.V. Thomas, B. Paull, *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 701-707.
- [6] D. Hummel, D. Loeffler, G. Fink, T.A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7321-7328.
- [7] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4212-4222.
- [8] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, *Anal. Chim. Acta* 768 (2013) 102-110.
- [9] M. Östman, J. Fick, E. Näsström, R.H. Lindberg, *Sci.Total Environ.* 472 (2014) 862-871.
- [10] S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4989-5000.
- [11] Uso de benzodiacepinas en España 1992-2006. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Disponible en: http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/ansioliticos_hipnoticos.pdf.
- [12] Encuesta sobre alcohol y drogas en la población general en España (EDADES) 2011-2012. Ministerio de Salud, Servicios Sociales e Igualdad. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>.
- [13] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 587-598.
- [14] S. Kinani, S. Bouchonnet, N. Milan, I. Ricordel, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 131-137.
- [15] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, M. Möder, *Anal. Chim. Acta* 716 (2012) 119-127.
- [16] M. van Pinxteren, A. Paschke, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2589-2598.

- [17] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (FPSE), US Patent Application US14/216,121, March 17, 2014.



METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO

En este apartado se incluyen las siguientes publicaciones:

Publication III.1

“DETERMINATION OF Δ^9 -TETRAHYDROCANNABINOL AND 11-NOR-9-CARBOXY- Δ^9 -TETRAHYDROCANNABINOL IN WATER SAMPLES BY SOLID-PHASE MICROEXTRACTION WITH ON-FIBER DERIVATIZATION AND GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY”

Inés Racamonde, Eugenia Villaverde-de-Sáa, Rosario Rodil, José Benito Quintana, Rafael Cela

Journal of Chromatography A 1245 (2012) 167-174

Publication III.2

“IN-SAMPLE DERIVATIZATION-SOLID-PHASE MICROEXTRACTION OF AMPHETAMINES AND ECSTASY RELATED STIMULANTS FROM WATER AND URINE”

Inés Racamonde, Rosario Rodil, José Benito Quintana, Rafael Cela

Analytica Chimica Acta 770 (2013) 75-84





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of Δ 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography–mass spectrometry

Inés Racamonde, Eugenia Villaverde-de-Sáa, Rosario Rodil, José Benito Quintana*, Rafael Cela

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, IIAA-Institute for Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela, R/Constantino Candeira S.N., 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2012

Received in revised form 3 May 2012

Accepted 3 May 2012

Available online 12 May 2012

Keywords:

Illicit drugs

Water samples

Cannabinoids

Solid-phase microextraction (SPME)

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

Derivatization

ABSTRACT

A new method for the determination of two cannabinoids, Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol (THCCOOH), in wastewater samples is proposed using solid-phase microextraction (SPME) as extraction technique and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) as determination technique. Several parameters involved in SPME extraction were studied and optimized (time, temperature, volume, pH and ionic strength of sample, and type of fiber). Moreover two derivatization reagents, N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and N-methyl-N-(tert-butyltrimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA), were studied in depth, providing MSTFA the best results. The use of internal standard calibration (with their corresponding deuterated analogs) allows avoiding standard addition calibration for the quantification of samples. Under optimal conditions, limits of detection at low nanograms per liter were achieved (1.0 and 2.5 ng L⁻¹ for THC and THCCOOH respectively). Precision (RSD < 15%) and trueness (92–112% relative recovery) were also satisfactory. Analysis of several samples from a wastewater treatment plant (WWTP) shows the presence of cannabinoids at notable concentrations in raw wastewater (12–35 ng L⁻¹ for THC and 50–153 ng L⁻¹ for THCCOOH) and an incomplete removal, which translates into their detection in the receiving river.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

One of the most relevant problems in terms of public health of global concern is the consumption of illicit drugs. In particular, consumption of cannabinoids increased during the nineties and early twenty first century and, currently, cannabis consumption is considered stable but accompanied by a slight increase in simultaneously abuse with other drugs (polyconsumption). Cannabis is the most widely consumed illicit drug in the World. According to the United Nations Office on Drug and Crime (UNODC), between 125 and 203 million people (2.8–4.9% of the Globe population) consumed cannabis in 2009 [1]. In Europe, these figures are even higher, as 3.6% and 6.7% of the population between 15 and 64 years consumed cannabis during the last month and last year, respectively; while 23.2% of Europeans have tried cannabis at least once in their lives [2]. Moreover, Spain ranks as the highest last-month

prevalence (7.6%) country in Europe and third one if the period refers to the last year (10.6% prevalence) [2].

These prevalence studies are elaborated by different national and international organisms through surveys to the population and data from seizures, etc. However, such kind of surveys may be inaccurate, as most information is obtained from abusers, and they can only provide estimations on a large temporal and spatial scale. On the other hand, an alternative strategy, termed as sewage epidemiology, has been recently developed by Zuccato et al. [3]. Sewage epidemiology is based on the study of the drugs and metabolites residues in sewage water. Hence, it can provide a rapid estimation without invading people privacy, it is cheaper than population surveys and the information can be obtained in a local scale and contrasted in a small period of time, detecting changing trends promptly [4]. This approach has now been widely applied by different research groups in Europe and the Americas [5–14]. Furthermore, these illicit drugs are just partially eliminated at wastewater treatment plants (WWTPs) and can reach surface water [3,7,9,15–19]. Thus, the presence of these drugs in the aquatic environment could be a serious risk to aquatic organism and the environment. Although the ecotoxicological effects of these

* Corresponding author. Tel.: +34 881814263/881816035; fax: +34 881816027.
E-mail address: jb.quintana@usc.es (J.B. Quintana).

pollutants have still not been investigated, several therapeutics drugs have already shown to have a relevant impact on the aquatic environment [20–22], so that environmental effects from illicit drugs would not be surprising.

The group of cannabinoids involves around sixty compounds, where Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), Δ^8 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol are the major constituents of cannabis; being THC the most powerful psychoactive substance among them [2,23,24]. THC is almost completely metabolized in liver, producing 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH) and its glucuronide as the main urinary metabolites. Thus, THCCOOH is widely used as biological marker of consumption and it has been reported in several environmental and sewage epidemiology studies [4].

Indeed, accurate and sensitive methods are required in order to evaluate the presence of cannabinoids at low concentrations in wastewater. To date, the determination of cannabinoids, together with other drugs of abuse, is almost exclusively performed by solid-phase extraction (SPE) preconcentration followed by liquid chromatography–electrospray–(tandem) mass spectrometry (LC–MS/MS) determination [6,11,15,16,25–31]. However, the efficiency of ESI is comparatively low for cannabinoids, as related to most illicit drugs, so that the limits of detection (LODs) obtained for this class of compounds are in some cases relatively high [6,25,26,30]. Actually, many published methods for the determination of multiple illicit drugs in water do not include cannabinoids, in spite of being the most consumed drug [10,15,29,32,33]. Hence, an alternative that combines SPE with derivatization and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) for the determination of several drugs of abuse, including THC and THCCOOH, has been proposed by our research team recently [34]. Yet, all published methods rely on SPE for the extraction and preconcentration of drugs from water samples. However, SPE requires relatively large volumes of sample extracted and a further concentration of the organic extract in order to achieve the required LODs [4].

Hence, the aim of this work was the development and validation of a new method for the determination of THC and THCCOOH in water samples based on solid-phase microextraction (SPME) and GC–MS. SPME has already been proven as a good alternative to SPE for the determination of several pollutants in water [35,36], including pharmaceuticals [35,37] and estrogens [38,39], which are derivatized on the SPME fiber after extraction. Moreover, it can be fully automated at-line to GC–MS [39], it does not require the use of organic solvents and reduces sample intake, as compared to SPE. To the best of our knowledge this is the first application of SPME for the determination of cannabinoids in water samples, despite being relatively common in forensic analysis and detection of drugs in biological samples [40–42].

2. Experimental

2.1. Materials and chemicals

The compounds considered, THC and THCCOOH, were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) as 1 mg mL^{-1} solutions in methanol. Deuterated compounds, THC- d_3 and THCCOOH- d_3 , were used as surrogated internal standards (ISs) and also obtained from Cerilliant (0.1 mg mL^{-1} in methanol). The structures of these compounds and some relevant physico-chemical properties are compiled into Table 1.

The derivatization reagents used in this work, N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and N-methyl-N-(*tert*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA) were purchased from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

A solution of 1 M of hydrochloric acid (Merck, Darmstadt, Germany) was used to adjust the sample pH. Sodium chloride was purchased from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Gradient A-10 system (Millipore, Bedford, MA, USA).

A manual SPME holder and SPME fibers coated with different polymers were purchased from Sulpeco (Bellefonte, PA, USA). The coatings tested in this work were: poly(dimethylsiloxane) (PDMS, $100\text{ }\mu\text{m}$ film thickness), polyacrylate (PA, $85\text{ }\mu\text{m}$ film thickness), carboxen–poly(dimethylsiloxane) (CAR–PDMS, $75\text{ }\mu\text{m}$ film thickness), poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene (PDMS–DVB, $65\text{ }\mu\text{m}$ film thickness) and divinylbenzene–carboxen–poly(dimethylsiloxane) DVB–CAR–PDMS ($50/30\text{ }\mu\text{m}$ film thickness).

Before being used for the first time, all SPME fibers were thermally conditioned as recommended by the supplier.

2.2. Samples and solutions

Mixed stock solutions containing all target analytes or their deuterated analogs were prepared in acetonitrile at a concentration of $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ and stored at -20°C in the dark. These stock solutions were then diluted with acetonitrile to obtain mixed working solutions of concentrations of $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 ng mL^{-1} and 20 ng mL^{-1} , which were used to spike water samples at different levels. Calibration standards were prepared by spiking Milli-Q water with increasing concentrations of THC and THCCOOH, and 100 ng L^{-1} of each IS.

Sewage grab samples were obtained from the influent and effluent of a WWTP equipped with a primary and secondary (activated sludge) treatment, and located in the northwest of Spain, which receives the discharges of ca. 125,000 inhabitants. River water samples were collected in River Sar, about 5 km downstream after receiving the discharges of a municipal WWTP.

All water samples were collected in 250 mL amber glass bottles, previously washed with methanol and ultrapure water and rinsed with the sample. They were filled up completely and stored at 4°C in the fridge. All the samples were analyzed prior 24 h after sampling. Before analysis, samples were filtered with $0.45\text{ }\mu\text{m}$ nitrocellulose filters (Millipore, Milford, MA, USA) to remove particulate matter and adjusted at the desired pH.

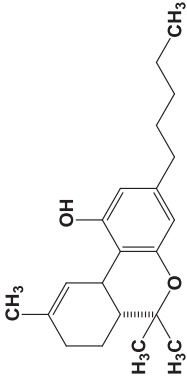
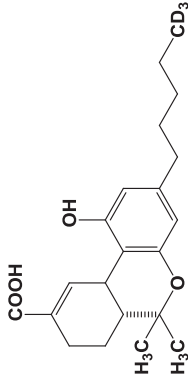
2.3. Solid-phase microextraction procedure

Different experimental conditions were tested along the optimization procedure, as detailed in Section 3. Finally, under optimal conditions, 10 mL of filtered water sample, spiked with the deuterated compounds (100 ng L^{-1}) and adjusted to $\text{pH}=2$ were transferred into a 10 mL headspace vial containing a PTFE-coated stir bar and crimp-sealed with a PTFE-coated septa aluminum cap. Then, the DVB–CAR–PDMS fiber was introduced through the septum and extraction took place by direct SPME during 60 min at 60°C with magnetic stirring at 400 rpm. After that, the fiber was retracted into the SPME holder and any drops of water were removed from the surface of the metallic needle with a soft paper tissue to avoid any contact with the derivatization reagent in the subsequent step. Derivatization was performed by exposing the fiber to the headspace of a 2 mL crimp-cap vial containing 50 μL of MSTFA during 10 min in an oven at 40°C . Finally, the fiber was removed from the vial and desorbed in the injection port of the GC–MS at 250°C during 3 min for the analysis of cannabinoid derivatives.

2.4. Gas chromatography–mass spectrometry

Separation and detection of analytes and ISs were carried out in an Agilent (Wilmington, DE, USA) 7890A gas

Table 1
Structures, physico-chemical and GC–MS parameters of target compounds.

Compound	Structure	Empirical formula	Monoisotopic MW	CAS number	pK _a	log K _{ow}	Pv/torr	Retention time/min ^a	Quantification ion ^a	Qualifiers ions ^a
THC		C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.22	1972-08-3	10.6 ^b	7.60 ^b	4.63e–8 ^b	22.68	386.26	303.21 371.24
THC-d ₃		C ₂₁ H ₂₇ D ₃ O ₂	317.22	81586-39-2	–	–	–	22.60	386.28	306.24 374.26
THCCOOH		C ₂₁ H ₂₈ O ₄	344.20	56354-06-4	4.68 ^c	6.21 ^c	1.62e–9 ^c	35.97	371.24	473.25 488.28
THCCOOH-d ₃		C ₂₁ H ₂₅ D ₃ O ₄	347.20	136844-96-7	–	–	–	35.90	374.26	476.27 491.30

^a From the silylated compounds (TMS derivatives).^b Experimental values obtained from PhysProp database (Sycurance Research Corporation).^c Software estimated values obtained from Scifinder Scholar 2007 database.

chromatograph connected to a quadrupole type mass spectrometer (Agilent MSD5975C), furnished with a J&W HP-5MS type capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., df: 0.25 μm) supplied by Agilent. The carrier gas was helium (99.999%) at a constant flow of 1.0 mL min⁻¹. The GC oven was programmed as follows: 90 °C (held for 3 min), ramped at 25 °C min⁻¹ to 170 °C and finally at 2 °C min⁻¹ to 280 °C and held for 5 min, with a total run time of 66.2 min. The mass analyzer, equipped with an electron-impact (EI) ionization source, was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode. Ionization source, mass analyzer and transfer line temperatures were set at 230, 150 and 280 °C, respectively. SPME fibers were desorbed at 250 °C (PDMS–DVB, PDMS and DVB–CAR–PDMS) or 280 °C (PA and CAR–PDMS) for 3 min, keeping the injector in the splitless mode during that time. Retention times and *m/z* ratios used to monitor the signal of each compound are summarized in Table 1.

2.5. Software and calculations

The GC–MS system was operated with the Agilent Chemstation E.02. Experimental design creation and analysis were performed with the software Statgraphics Centurion 16.1 (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA).

The kinetics of the SPME were fitted with the software Graphpad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). To this end, the equation proposed by Chen and Pawliszyn [43] can be transformed assuring that the amount extracted is directly related to the area of the analyte (i.e. data is obtained in the linear range of the GC–MS) into the following simple expression:

$$A = A_{\max}(1 - e^{-at}) \quad (1)$$

where *A* is the area of the analyte at a determined extraction time, *A*_{max} is the area of the analyte extracted when the equilibrium is reached (at *t* = ∞), *a* is the kinetic constant, and *t* is the extraction time.

Moreover, the time needed to reach the equilibrium, defined as the time required to reach 95% of *A*_{max}; *t*₉₅ can be calculated as:

$$t_{95} = \frac{2.996}{a} \quad (2)$$

3. Results and discussion

3.1. Optimization process

3.1.1. Preliminary assays

The two cannabinoids studied, particularly THCCOOH, have polar acidic moieties that need to be derivatized before their separation and determination by GC–MS [44]. Among the different derivatization reagents for cannabinoids, silylating agents are the most popular ones [31,34,41,42,45], which, moreover, have been proven as excellent reagents for on-fiber derivatization after SPME extraction of several polar pollutants [35,36]. Hence, two silylating agents were tested: MSTFA and MTBSTFA. However, the use of MTBSTFA yielded an incomplete on-fiber derivatization of the cannabinoids and, thus further studies were performed with MSTFA. This agent yields the mono-trimethylsilyl derivative of THC by reaction with the phenolic group and di-trimethylsilyl derivative of THCCOOH by reacting also with the carboxylic moiety.

Also, in SPME, there are two typical modes of work: (a) direct, where the fiber is immersed and in direct contact with the sample or (b) headspace, where the fiber is exposed to the air layer situated above the sample (headspace). This second procedure of extraction is specially recommended for complex matrices or volatile compounds [46–49]. Although, the vapor pressure of cannabinoids is low, both working procedures were tested with spiked Milli-Q water extracted during 60 min. However, peak areas obtained in the

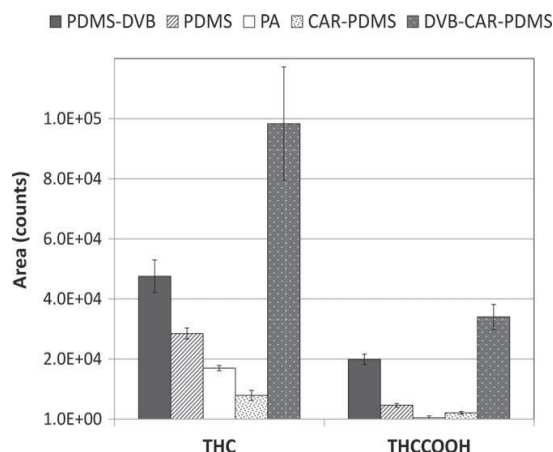


Fig. 1. Comparison between different fibers for the direct SPME of cannabinoids.

headspace mode of operation were lower than in direct mode, even when the temperature was increased to 100 °C (data not shown). Therefore, the headspace mode was discarded and further experiments were performed by direct SPME.

3.1.2. Fiber coating

Nowadays, a great variety of SPME fiber coatings is available, with different polarities and thicknesses. The best option depends on the physico-chemical characteristics of the analytes; in this study, five fibers were tested: PDMS (apolar), PDMS–DVB and CAR–PDMS (both semipolar), PA (polar), and DVB–CAR–PDMS (polar to semipolar). All fibers were properly conditioned as recommended by the manufacturer.

These experiments were carried out by the direct SPME mode during 40 min in 20 mL of Milli-Q water at pH 3 spiked with 2 ng mL⁻¹ of the analytes. On-fiber derivatization was performed after extraction in 2 mL vials by exposing the SPME fiber to the headspace of 50 μL of MSTFA during 20 min at 60 °C. As shown in Fig. 1, the best results were obtained with DVB–CAR–PDMS followed by the PDMS–DVB fiber, while the remaining coatings provided much lower responses, particularly for THCCOOH. One of the factors that benefits extraction on the DVB–CAR–PDMS blend fiber is the fact that its length is the double of the remaining ones. A disadvantage of this coating (as all those containing PDMS) is a continuous bleeding of siloxanes that can interfere with cannabinoids determination. Thus, a relatively long GC separation program needs to be used. Yet, the 60 min required for separation fit well with the final extraction time (see Section 3.1.6) so that throughput is not compromised.

3.1.3. Derivatization

For the optimization of the on-fiber derivatization step, a Box–Behnken response surface design was carried out in order to simultaneously studying the volume of MSTFA, the time and temperature of derivatization. This type of experimental design comprised a total of sixteen experiments, including four central points, covering derivatization times between 10 and 30 min, temperatures between 30 and 70 °C and volumes of MSTFA between 10 and 60 μL, selected according to the literature for other analytes determined by on-fiber SPME silylation [35–39]. SPME extraction time was fixed at 40 min at room temperature with a DVB–CAR–PDMS fiber; the Milli-Q sample (20 mL), adjusted to pH 3, was spiked with 2 ng mL⁻¹ of both compounds for all the experiments. The statistical analysis showed that none of the factors was statistically (95% significance level) relevant. Hence, these factors

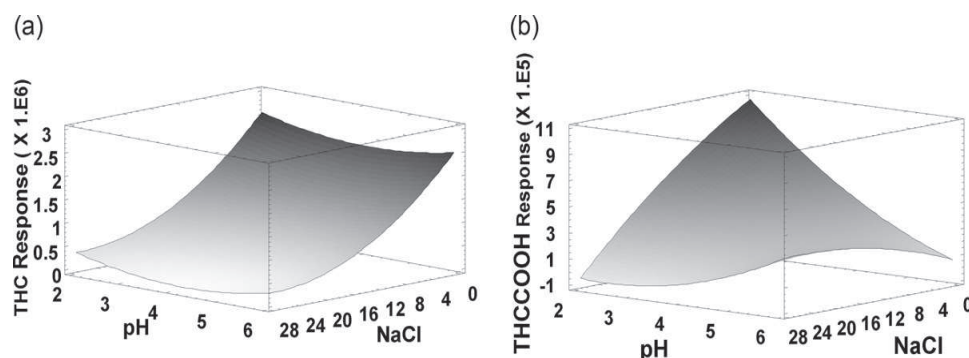


Fig. 2. Response surfaces of NaCl vs. pH for: (a) THC and (b) THCCOOH.

were fixed based on practical reasons: 40 °C (lower temperatures may be difficult to control during warm seasons), 10 min (method throughput) and 50 μ L of MSTFA (based on pipetting convenience).

3.1.4. Sample pH and ionic strength

Bearing in mind the acidic character of THCCOOH ($pK_a = 4.68$), the sample pH may constitute a critical factor on its extractability by SPME. Moreover, the addition of NaCl is typically employed in order to improve the extraction efficiency of polar analytes, since an increase of the ionic strength in the samples can produce a diminution in the solubility of the analytes in water, enhancing their partitioning to other phases (SPME fiber in this case) [50–52]. These two factors were evaluated together, as the literature shows that they may interact when analytes with acidic or basic moieties are extracted by SPME [37]. Hence, a Doehlert experimental design was performed to evaluate them together. This surface response design permits the study of one factor at 3 levels (in this case the pH, between 2 and 6) and the other one at 5 levels (0–28% NaCl addition), comprising a total of 10 experiments (including 4 replicates of the central point of the experimental domain). SPME was performed during 40 min at ambient temperature with 20 mL Milli-Q spiked water samples (at 2 ng mL⁻¹). The on-fiber derivatization was carried out as optimized in the previous section.

The response of each analyte (area) was evaluated for its statistical relevance (95% significance level). It was found that THC is not affected by the sample pH, in accordance with the fact that the pK_a of the phenolic group is outside the considered pH range. However, the first order term related to NaCl was negative and statistically relevant, but also the quadratic term corresponding to NaCl was statistically significant. This is easily visualized in Fig. 2a, where it is clear that addition of NaCl decreases the extraction efficiency (first-order term) and also, that the drop-off is not linearly correlated with the NaCl increase (quadratic term).

Regarding THCCOOH, its response is both significantly and negatively influenced by the pH and NaCl concentration. Moreover, the interaction term between both factors was statistically significant, while the quadratic terms of those factors were not relevant. As presented in Fig. 2b, this interaction represents that at high pH there is no effect of the ionic strength, while at low pH the increase on NaCl reduces the extractability of THCCOOH, showing that the highest response is obtained at pH 2 without NaCl addition. The fact that NaCl plays a relevant negative role for both cannabinoids when they are in the neutral form can be interpreted in slowed extraction kinetic at higher ionic strengths, due to the relatively high $\log K_{ow}$ of these analytes. On the other hand the relevance of the sample pH for THCCOOH is clearly associated to an enhanced extractability of the neutral species prevailing at low pH values. Hence, acidification of samples to pH = 2, without salt addition was selected as optimal conditions for further experiments.

3.1.5. Sample volume

A further considered factor, before the study of extraction kinetics, is the volume of sample. Theoretically, for analytes with a high partition coefficient, a larger sample volume leads to higher mass of analyte extracted to the SPME fiber and, hence, an increased sensitivity [53]. Therefore, this factor was evaluated for three different volumes fitting conventional crimp-cap vials: 10, 20 and 100 mL. Triplicate SPME were performed with Milli-Q samples spiked at the same level of concentration (2 ng mL⁻¹) extracted for 60 min in the conditions previously optimized.

The results of these experiments showed that the area of the analytes did not significantly increase with the sample volume and, thus, 10 mL of sample were chosen in order to minimize sample intake (data not shown).

3.1.6. Extraction time and temperature

Temperature is a key parameter in SPME, that, in one hand, decreases the time required to reach the equilibrium by increasing the diffusion process toward the fiber [53]. But, on the other hand, since the extraction process is exothermic, a rise of the temperature results into a decrease of the amount of analyte extracted due to the decrease of the partition coefficient [53]. Hence, in this work, the SPME kinetics were studied at three different temperatures: room temperature (22 ± 1 °C), 60 °C and 80 °C under the previously optimized conditions with spiked Milli-Q samples (2 ng mL⁻¹). The results of these experiments were fitted to Eq. (1) as described in Section 2.5, and the kinetic plots and parameters are presented in Fig. 3 and Table 2. As expected, the time required to reach the equilibrium decreased with the increment of temperature. Hence, for THC, the equilibrium (t_{95}) is reached after ca. 6.7 h, 2.7 h and 2.1 h, when the SPME temperatures are 22 °C, 60 °C and 80 °C, respectively. In the case its metabolite, THCCOOH, the extraction is slower, requiring ca. 4 h at 80 °C, 5 h at 60 °C and more than 1 day at room temperature (Table 2). It should be noted, however, that the estimation of t_{95} at room temperature (22 °C) for THCCOOH has a large uncertainty, since longer SPME times would be required to obtain a better prediction. Moreover, bubbles of air are formed at room temperature, which stick to the SPME fiber, rendering a larger variability. Those bubbles are not observed at higher temperatures. Yet, Fig. 3 also shows the second consequence of the increase of

Table 2

Kinetics fitting parameters of SPME at different temperatures. See section 2.5 for details.

	THC			THCCOOH		
Temperature (°C)	22	60	80	22	60	80
<i>a</i>	7.5e–3	1.8e–2	2.4e–2	3.5e–7	9.0e–3	1.2e–2
<i>R</i> ²	0.99	0.94	0.94	0.97	0.99	0.90
<i>t</i> ₉₅ (min)	398	164	126	8.48e6	294	240

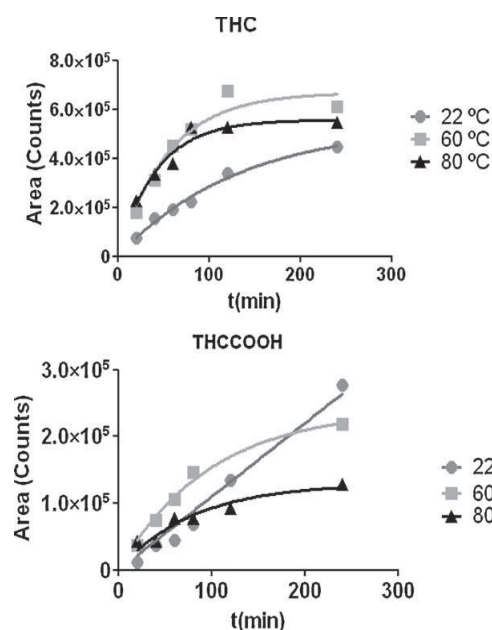


Fig. 3. Plot of the SPME kinetics at different temperatures for (a) THC and (b) THCCOOH.

temperature, i.e. a decrease of the extracted amount at the equilibrium due to the reduced partition coefficient of the analytes toward the fiber. Therefore, and bearing in mind that the chromatographic run time is about 1 h, the SPME extraction time was set at 60 min and the temperature at 60 °C, which provides the best extraction yield for that extraction time (Fig. 3).

3.1.7. Desorption time and carry-over effect

The time of fiber desorption in the injection port of the GC was the final parameter considered because a short time could cause a carry-over effect, as well as bad reproducibility in the peak area and low sensitivity.

Thus, it was tested if any carry-over was detected at a high concentration level (4 ng mL^{-1}) after 3 min of fiber desorption, by desorbing the fiber a second time. Less than 0.05% of the analytes was detected in the second desorption, which is close to the LODs of the method. Hence, it can be concluded that 3 min of thermal desorption at 250 °C is enough to achieve a good transfer between the fiber and the chromatograph without significant carry-over at typical environmental levels of cannabinoids, which are much lower than 4 ng mL^{-1} (see Section 3.3). Nevertheless, an additional desorption time of 3 min was applied to avoid interferences and to secure the correct conditioning of fiber after the SPME of complex sewage samples.

3.2. Method performance

SPME, as other microextraction approaches, may be subject to matrix effects due to the presence of matrix constituents, such as dissolved organic matter, that can alter the partition coefficient between the sample and the fiber. As a result, extraction of wastewater samples is less efficient than the model ultrapure water used to build the calibration [53]. Therefore, this effect was investigated with surface, raw and treated sewage water. The assay was carried out by triplicated extraction of these samples under optimal SPME conditions. All the samples were spiked with 500 ng L^{-1} of target compounds and 100 ng L^{-1} of ISs and the results in terms

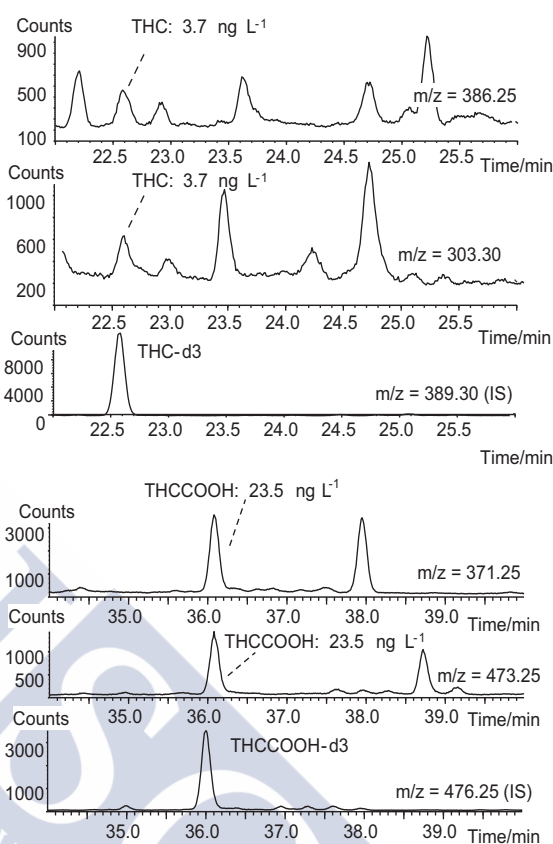


Fig. 4. Chromatogram of a treated wastewater sample (no. 3 in Table 4) showing the quantification and first qualifier ion of the analytes and quantification ion for the internal standards (100 ng L^{-1}).

Table 3
Performance figures of the analytical method.

	THC	THCCOOH
LOD (ng L^{-1}) ^a	1.0	2.5
LOQ (ng L^{-1}) ^b	3.3	8.3
R^2 ^c	0.9998	0.9998
Trueness ^d		
Raw wastewater	104	112
Treated wastewater	98	92
Surface water	94	96
Precision (%RSD)		
Raw wastewater ^e	8.5%	14.7%
Treated wastewater ^e	7.7%	1.3%
Surface water ^e	1.4%	2.2%
Milli-Q ^e	0.6%	2.5%
Milli-Q ^f	5.0%	10%

^a $S/N = 3$ (from raw wastewater).

^b $S/N = 10$ (from raw wastewater).

^c 5–1000 ng L^{-1} calibration with 100 ng L^{-1} of ISs.

^d As % relative recovery, calculated for samples spiked at 500 ng L^{-1} level and containing 100 ng L^{-1} of ISs ($n = 4$).

^e Samples spiked at 500 ng L^{-1} level and 100 ng L^{-1} of ISs ($n = 4$).

^f Samples spiked at 50 ng L^{-1} level and 100 ng L^{-1} of ISs ($n = 4$).

of area compared to ultrapure water samples spiked at the same concentration level, after non-spiked sample response subtraction. This assay showed a reduction of ca. 30% in signal with wastewater samples for both compounds (data not shown). Nevertheless, matrix effects were successfully corrected with the deuterated ISs. Hence, as shown in Table 3, good trueness and precision values

Table 4
Concentrations (ng L⁻¹) of THC and THCCOOH detected in the samples (n = 3).

Sample no.	THC	THCCOOH
Raw wastewater		
1	35 ± 4	126 ± 5
2	14 ± 2	50 ± 4
3	15.1 ± 0.1	133 ± 1
4	12 ± 2	153 ± 21
Treated wastewater		
1	7.6 ± 0.7	<LOQ
2	4.8 ± 0.5	28 ± 4
3	3.7 ± 0.2	24 ± 2
4	4.7 ± 0.2	18.3 ± 0.3
Surface water		
1	3.7 ± 0.4	10 ± 1
2	<LOQ	9.5 ± 0.5

were obtained, with relative recoveries in the 92–112% range and RSD values lower than 15%. These relative recoveries are obtained by the internal standard calibration method after subtraction of the non-spiked sample area ratios. Moreover, the method exhibited an excellent linearity, with determination coefficients higher than 0.9998 in the LOQ–1000 ng L⁻¹ range. Detection (LODs) and quantification limits (LOQs) were calculated for a signal-to-noise (S/N) of 3 and 10, respectively, following the Eurachem recommendations [54], from an influent wastewater sample. The values attained can be regarded as satisfactory (Table 3), being slightly higher than those obtained by SPE and GC–MS/MS [34]. Regarding methods based on SPE and LC–MS/MS, there is a variety of reported LOD/LOQs. Most authors report LOQs at the mid-ng L⁻¹ range (ca. 10–100 ng L⁻¹) [6,17,26], while a couple of authors reporting them at the 0.5–2 ng L⁻¹ [25,55] and one publication shows LOD of 2500 ng L⁻¹ for THCCOOH in raw wastewater [30].

3.3. Application to real samples

The developed method was finally used to evaluate the presence of cannabinoids in grab sewage samples of a WWTP, taken on four different days. As presented in Table 4, THC and THCCOOH were detected in all influents in the 12–35 ng L⁻¹ and 50–153 ng L⁻¹ ranges, respectively. Both compounds were still detected after the WWTP treatment, but at lower concentrations: 3.7–7.6 ng L⁻¹ of THC, and below the LOQ to 29 ng L⁻¹ of the metabolite. Moreover, two samples of surface water were collected downstream the sewage treatment plant, showing still detectable amounts of the cannabinoids (Table 4). A chromatogram of one of the effluent wastewater samples is presented in Fig. 4.

In reference to raw wastewater samples, our results are in concordance with published European data [8,25], including Spain [6,9,17,34,56]. However, the concentrations detected in treated sewage are higher than several studies in Europe [8,18,25] where the metabolite is mainly not detected, but similar to the values reported in the east of Spain [9,17,55]. The same trend is attained for surface water, as THC is not detected [18] or detected at very low concentrations (less than 4 ng L⁻¹ in several Italian rivers [57]), in Europe, whereas concentrations reported in the northeast of Spain are more similar to those found in this work, but still lower [9,17]. It should be noted, however, that many published methods do not provide the adequate LOQs for the measurement of cannabinoids in surface water, or they are modified by increasing the sample volume up to 1 L to decrease them [57].

4. Conclusions

This study presents the first method based in SPME on-fiber derivatization combined with GC–MS to determine trace levels of two cannabinoids in water samples. After a careful optimization, a

SPME method that can reach LODs at the low ng L⁻¹ level, with good precision and accuracy is proposed. Compared to other published methods based on SPE and LC–MS/MS it has several advantages, viz.: lower sample intake (just 10 mL), solventless extraction, lower investment required on instrumentation, full unattended automation being possible, and low LODs achieved. On the other hand, the main drawback of the proposed method is that it is limited to the two main cannabinoid compounds, whereas SPE based methods permit the determination of several drugs simultaneously.

Acknowledgements

This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Ministerio de Ciencia e Innovación) through: Project Nos. CTQ2009-08377 and CTQ2010-18927; FPI grants (awarded to Inés Racamonde and Eugenia Villaverde-de-Sáa) and Ramón y Cajal research program (awarded to Rosario Rodil and José Benito Quintana). We are grateful to Aquagest for providing access to wastewater samples.

References

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) World Report 2011, UNODC, New York, 2011.
- [2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) Annual Report 2011, EMCDDA, Luxembourg, 2011.
- [3] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, D. Calamari, R. Bagnati, S. Schiarea, R. Fanelli, *Environ. Health* 4 (2005) 1.
- [4] A.L.N. van Nuijs, S. Castiglioni, I. Tarcomnicu, C. Postigo, M. López de Alda, H. Neels, E. Zuccato, D. Barceló, A. Covaci, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 3564.
- [5] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1773.
- [6] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, M. González-Díez, R. Cela, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1708.
- [7] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Environ. Int.* 36 (2010) 75.
- [8] S. Terzić, I. Senta, M. Ahel, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2686.
- [9] M.R. Boleda, M.T. Galcerán, F. Ventura, *Water Res.* 43 (2009) 1126.
- [10] J. Bones, K.V. Thomas, B. Paull, *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 701.
- [11] C. Metcalfe, K. Tindale, H. Li, A. Rodayan, V. Yargeau, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3179.
- [12] A.L.N. van Nuijs, B. Pecceu, L. Theunis, N. Dubois, C. Charlier, P.G. Jorens, L. Bervoets, R. Blust, H. Meulemans, H. Neels, A. Covaci, *Addiction* 104 (2009) 734.
- [13] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 1027.
- [14] S. Karolak, T. Nefau, E. Bailly, A. Solgadi, Y. Levi, *Forensic Sci. Int.* 200 (2010) 153.
- [15] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1620.
- [16] M.R. Boleda, M. Huerta-Fontela, F. Ventura, M.T. Galcerán, *Chemosphere* 84 (2011) 1601.
- [17] M.R. Boleda, M.T. Galcerán, F. Ventura, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 38.
- [18] J.D. Berset, R. Brenneisen, C. Mathieu, *Chemosphere* 81 (2010) 859.
- [19] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3821.
- [20] O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, *Ecotoxicity of Pharmaceuticals, Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle*, Elsevier, Amsterdam, 2007, p. 387.
- [21] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122.
- [22] M. Zaleska-Radziwill, M. Lebrowska, K. Affek, A. Zarzecka, *Arch. Environ. Protect.* 37 (2011) 31.
- [23] M. Melis, S. Castiglioni, E. Zuccato, in: S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli (Eds.), *Metabolism and Excretion of Illicit Drugs in Humans, Illicit Drugs in the Environment: Occurrence, Analysis and Fate Using Mass Spectrometry*, Wiley, New Jersey, 2011, p. 31.
- [24] R.C. Balse, *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, Biomedical Publications, Seal Beach, CA, 2004.
- [25] S. Castiglioni, E. Zuccato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8421.
- [26] M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1091.
- [27] P. Vázquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2851.
- [28] D. Hummel, D. Loeffler, G. Fink, T.A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7321.
- [29] A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 819.
- [30] L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibáñez, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3078.
- [31] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Rodil, J. González-Peñas, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8435.
- [32] A.C. Chiaia, C. Banta-Green, J. Field, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8841.

- [33] M.J. Martínez Bueno, S. Ucles, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Talanta* 85 (2011) 157.
- [34] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1217 (2009) 1748.
- [35] P.C.F.d.L. Gomes, J.Y. Barletta, C.E.D. Nazario, A.J. Santos-Neto, M.A. Von Wolff, C.M.R. Coneglian, G.A. Umbuzeiro, F.M. Lancas, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 436.
- [36] J.B. Quintana, I. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1447.
- [37] I. Rodríguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 1.
- [38] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 179.
- [39] L. Yang, C. Lan, H. Liu, J. Dong, T. Luan, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 391.
- [40] M. Yonamine, N. Tawil, R.L.d.M. Moreau, O.A. Silva, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 73.
- [41] G. Merola, S. Gentili, F. Tagliaro, T. Macchia, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2987.
- [42] U. Staerk, W.R. Kulpmann, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 399.
- [43] Y. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5807.
- [44] J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 61.
- [45] M. Pujadas, S. Pichini, E. Civit, E. Santamarina, K. Perez, R. De la Torre, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 594.
- [46] A. Espert, L.A. de las Heras, S. Karlsson, *Polym. Degrad. Stab.* 90 (2005) 555.
- [47] J. Beltrán, E. Pitarch, S. Egea, F.J. López, F. Hernández, *Chromatographia* 54 (2001) 757.
- [48] S. Waidyanatha, Y. Zheng, S.M. Rappaport, *Chem.-Biol. Interact.* 145 (2003) 165.
- [49] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 829.
- [50] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- [51] M. Fernández, C. Padrón, L. Marconi, S. Ghini, R. Colombo, A.G. Sabatini, S. Girotti, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 257.
- [52] N. Negreira, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 603.
- [53] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [54] The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM GUIDE, 1998.
- [55] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3123.
- [56] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Environ. Int.* 37 (2011) 49.
- [57] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, C. Chiabrando, P. Grassi, R. Fanelli, *Water Res.* 42 (2008) 961.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

In-sample derivatization-solid-phase microextraction of amphetamines and ecstasy related stimulants from water and urine



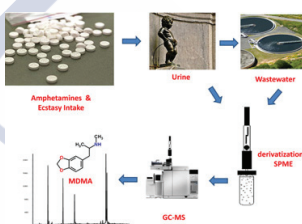
Inés Racamonde, Rosario Rodil, José Benito Quintana*, Rafael Cela

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, ILIA-Institute for Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela, R/Constantino Candeira SN, 15782 Santiago de Compostela, Spain

HIGHLIGHTS

- First SPME method for determination of amphetamines and ecstasy in (waste)water.
- In-sample simultaneous derivatization and extraction with *iso*-butyl chloroformate.
- Wastewater (100 mL): LODs: 0.4–2 ng L⁻¹, RSD < 15%; recoveries: 84–114%.
- Urine (1 mL): LODs: < 1 µg L⁻¹, RSD < 11%; recoveries: 98–110%.
- Solvent-free and fully automatable method.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2012

Received in revised form

14 December 2012

Accepted 1 February 2013

Available online 12 February 2013

Keywords:

Illicit drugs

Amphetamines

Ecstasy

3,4-Methylenedioxymethamphetamine

Derivatization

Solid-phase microextraction

ABSTRACT

A solid-phase microextraction (SPME) method for the determination of five amphetamine type stimulants (ATSs) in water and urine samples is presented. Analytes were simultaneously derivatized with *iso*-butyl chloroformate (iBCF) in the aqueous sample while being extracted, improving in this way the extractability of ATSs and permitting their determination by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The SPME procedure was carefully optimized in order to achieve adequate limits of detection (LODs) for environmental concentrations. Hence, different operational parameters were considered: type of SPME coating, ionic strength, basic catalyzer and derivatizing agent amount, extraction time and temperature. The final SPME procedure consists into the extraction of 100 mL of sample containing 2 g of dipotassium monohydrogen phosphate trihydrate and 100 µL of iBCF (1:1 in acetonitrile), for 40 min at 60 °C with a polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB) fiber. Under these conditions, LODs in wastewater ranged from 0.4 to 2 ng L⁻¹, relative recoveries in the 84–114% range and relative standard deviations (RSD) lower than 15% were obtained. The application of the method to wastewater and river water samples showed the ecstasy ATS, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), as the most frequently detected, followed by methamphetamine, in concentrations around 20 ng L⁻¹. Finally, the method was downscaled and also validated with urine samples, proving its good performance with this matrix too: RSD < 11%, recoveries in the 98–110% range and LODs lower than 0.1 µg L⁻¹.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amphetamines, including amphetamine (AMP) and methamphetamine (MAMP), and ecstasy, normally containing 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), but sometimes also the ethylated (MDEA) or demethylated analogs (MDA), were among the most popular illicit drugs in the discos during the 90s due to

* Corresponding author. Tel.: +34 881814263/+34 881816035;

fax: +34 881816027.

E-mail address: j.b.quintana@usc.es (J.B. Quintana).

their low price and potent hallucinogenic effects, as stimulants of the central nervous system [1,2]. Although their consumption has declined in the last years, still today, they remain among the most frequently consumed illicit drugs. For instance, 5.3 tons of amphetamine-type stimulants (ATSs) were seized in Europe in 2009 [1]. The 2011 Annual Report of the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) also shows that around 1.5 million people in Europe between 15 and 34 years (1.1% of the population in that age) have consumed amphetamines (AMP or MAMP) in the last year [1]. Data about ecstasy consumption are very similar to those of amphetamines, with about 1.4% of consumers in Europe during last year in the same range of age. It must be born in mind that amphetamines are also frequently encountered in ecstasy pills together with MDMA, MDEA and MDA [1].

ATSs are mainly excreted unmetabolized in the urine, as intact drugs [3]. Then, they are disposed in the sewage system and therefore, ATSs can reach surface water and even drinking water due to incomplete removal at conventional water treatment plants, as it has been demonstrated in several works [4–8]. Thus, ATS concentrations in environmental waters are typically at the low ng L⁻¹ level [9,10]. Therefore, their determination in environmental samples requires a preconcentration step. Normally, this is achieved by solid-phase extraction (SPE) [6,7,11–19]. Then, analytes are separated and determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) [6,7,11–18] or, less frequently, by gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) [19]. The disadvantages of the published methods include those arising from the use of SPE, e.g. moderate waste of organic solvents and possibility of clogging of the sorbent bed with complex samples. Also, in the case of LC–MS/MS, strong signal suppression leading to increased limits of detection and quantification (LODs and LOQs) with complex samples is frequently encountered, further hindered by the low *m/z* values of both precursor and products ions, which may result in problems for positive identification due to isobaric compounds altering transition ratios [18,20,21].

In this work, we propose a method for the determination of amphetamines and ecstasy substances in water samples by means of solid-phase microextraction (SPME) combined to GC–MS. SPME is a good alternative to SPE, as it can be easily automated at-line to GC–MS and eliminates solvent usage, being thus, a more environmentally friendly extraction technique and avoiding exposure risks to analysts [22,23]. On the other hand, GC–MS is an affordable alternative to LC–MS/MS, widely available in routine laboratories. Moreover, the combination of SPME and GC–MS has been successfully employed for the determination of several pharmaceuticals at trace concentrations in water samples [23–27], and recently also for cannabinoid compounds [24]. In fact, several publications are already available for the SPME of ATSs in biological fluids, providing good performance figures, although with too high LODs to be applicable for environmental samples [28–35]. Therefore, the SPME method was optimized and validated in order to achieve the desired LODs and applied to the analysis of real water samples of influent and effluent wastewater and surface water. Besides, as the determination of these substances in biological fluids is also of interest, particularly in urine [29–32,36], the developed method was further validated with that matrix.

2. Experimental

2.1. Materials and chemicals

(±)-Amphetamine (AMP), (±)-methamphetamine (MAMP), (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), (±)-3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) and their corresponding deuterated

compounds used as surrogated internal standards (ISs) were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) as 1 mg mL⁻¹ and 0.1 mg mL⁻¹ solutions in methanol, respectively. The structure of the analytes and position of the deuterium atoms in the ISs is presented in Table 1. *Iso*-butyl chloroformate (iBCF) 98%, and dipotassium monohydrogen phosphate trihydrate were purchased from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Gradient A-10 system (Millipore, Bedford, MA, USA). LC-grade acetonitrile was supplied by Merk (Darmstadt, Germany).

A manual fiber holder and SPME fiber assemblies were purchased from Sulpeco (Bellefonte, PA, USA). The fibers used in this study were poly(dimethylsiloxane) (PDMS, 100 μm film thickness), polyacrylate (PA, 85 μm film thickness), Carboxen–poly(dimethylsiloxane) (CAR–PDMS, 75 μm film thickness) and poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene (PDMS–DVB, 65 μm film thickness). All the fibers were thermally conditioned as recommended by the supplier.

2.2. Solutions

A mixed stock solution of the five analytes was prepared by dilution of the individual stocks until obtaining a concentration of 20 mg L⁻¹ in acetonitrile and stored in the dark at –20 °C. For the deuterated compounds, a mixed stock solution of 2 mg L⁻¹ was prepared from the individual commercial solutions. Subsequently, several standard mixtures were prepared at different concentrations by dilution of the mixed stock solution with acetonitrile. Solutions were renewed approximately about every month, although no degradation of ATSs was observed. These solutions were then used to spike Milli-Q and other water samples for calibration, optimization and validation experiments. Spiking volumes were kept to a maximum of 100 μL to avoid the ACN content in the sample being higher than 0.2%.

The pure derivatization agent, iBCF, was diluted 1:1 (v:v) and 1:10 (v:v) in acetonitrile. This permits the use of a convenient volume (100 μL) to minimize errors during the pipetting process and improves the solubility of iBCF in water.

2.3. Samples

The wastewater samples used along this study were obtained from a wastewater treatment plant (WWTP) serving an urban population around 130,000 inhabitants, located in the northwest of Spain. The WWTP consists of a primary and secondary activated sludge treatment. Moreover several river water samples were collected in the proximities of the point of discharge of the WWTP (ca. 5 km downstream) to evaluate the presence of ATSs after the wastewater treatment. Grab samples were collected in 1 L amber glass bottles, previously washed with methanol and ultrapure water and rinsed with the sample. They were filled up completely and stored at 4 °C in the fridge. All the samples were analyzed prior 12 h after sampling.

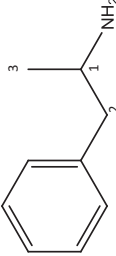
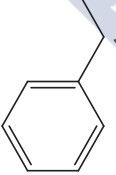

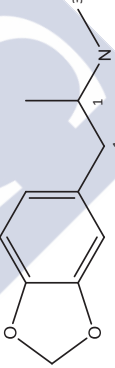
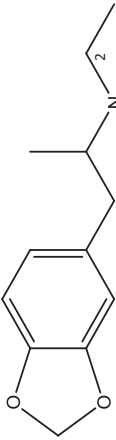
Drug-free urine samples were collected from a healthy volunteer and kept in a sterile vessel at 4 °C until their use.

Before analysis, samples were filtered through 0.45 μm nitrocellulose filters (Millipore, Milford, MA, USA) to remove particulate matter.

2.4. Solid-phase microextraction procedure

Several SPME parameters were tested during method development. Under the final optimized conditions, the procedure for ATSs determination in water samples was as follows: 100 mL of water previously filtered and spiked with the deuterated ISs (100 ng L⁻¹) was introduced into a 120 mL vial containing 2 g of K₂HPO₄·3H₂O

Table 1
Name, abbreviation, structure and GC–MS data for the analytes and the deuterated internal standards (ISs). Data in italics correspond to ISs.

Compound	Abbreviation	Structure ^a	GC–MS ^b				
			Retention time (min)	Molecular ion (<i>m/z</i>)	Quantification ion (<i>m/z</i>)	Confirmation ion I (<i>m/z</i>)	Confirmation ion II (<i>m/z</i>)
Amphetamine	AMP		13.55	235	144	91	57
Methamphetamine	AMP-d6		13.46	241	148	93	
	MAMP		14.09	249	158	91	102
3,4-Methylenedioxyamphetamine	MAMP-d5		14.01	254	162		106
	MDA		26.31	279	144	135	162
3,4-Methylenedioxymethamphetamine	MDA-d5		26.19	284	148		167
	MDMA		26.64	293	158	58	102
3,4-Methylenedioxylethylamphetamine	MDMA-d5		26.53	298	162		106
	MDEA		28.05	307	172	72	116
	MDEA-d5		27.93	312	177		121

^a The numbers in the structure indicate the position and number of deuterium atoms in the deuterated ISs.

^b Parameters refer to the IBCF derivatives.

and a PTFE-coated stir bar. Subsequently, 100 μL of iBCF (1:1) were added and the vial was crimp-sealed with a PTFE-coated septa aluminum cap. The solution was stirred for ca. 1 min to complete the dissolution of K_2HPO_4 and assure a good mixture and then, the PDMS-DVB SPME fiber was introduced in the stirred sample (600 rpm) during 40 min at 60 °C for extraction. Finally, the fiber was retracted and thermally desorbed in the injection port of the GC–MS at 250 °C during 3 min for separation and determination of analytes. In the case of urine, samples were diluted 10-fold with Milli-Q water prior extraction and 10 mL of these diluted samples were used within 10 mL vials. Consequently, the amounts of ISs and reagents was scaled down, so that 0.2 g of $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and 100 μL of iBCF solution (1:10) were used in this case, whereas the rest of the procedure remained the same.

2.5. Gas chromatography–mass spectrometry

An Agilent (Wilmington, DE, USA) 7890A gas chromatograph connected to a quadrupole type mass spectrometer (Agilent MSD5975C), furnished with an Agilent HP-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., df: 0.25 μm), was used. The carrier gas was helium (99.999%), kept at a constant flow of 1.0 mL min^{−1}. The GC oven was programmed as follows: 90 °C (held for 3 min), ramped firstly at 25 °C min^{−1} to 130 °C, then at 2 °C min^{−1} to 220 °C and finally at 30 °C min^{−1} to 280 (held for 5 min). The mass analyzer, equipped with an electron-impact (EI) ionization source, was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode. Ionization source, mass analyzer and transfer line temperatures were set at 230, 150 and 280 °C, respectively. SPME fibers were desorbed at 250 °C for 3 min, keeping the injector in the splitless mode during that time. The retention times and m/z values used for quantification and confirmation of analytes and ISs are compiled in Table 1.

2.6. Software and calculations

The GC–MS system was operated with the Agilent Chemstation E.02 software. Experimental design creation and analysis was performed with the Statgraphics Centurion 16.1 software (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA).

SPME kinetics were fitted with Graphpad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) to Eq. (1), as proposed by Chen and Pawliszyn [37], applying the same approach than in our previous work [24]:

$$A = A_{\max}(1 - e^{-at}) \quad (1)$$

where A is the area of analyte at a determined extraction time, A_{\max} is the area of analyte when the equilibrium is reached (at $t = \infty$), a is the kinetic constant, and t is the extraction time.

Moreover, the time needed to reach the equilibrium, defined as the time required to reach 95% of A_{\max} (t_{95}), can be calculated as [37]:

$$t_{95} = \frac{2.996}{a} \quad (2)$$

3. Results and discussion

3.1. Derivatization

ATSs are polar compounds containing an amine in their structure (see Table 1). For that reason, it is necessary to carry out a derivatization reaction prior to their GC–MS determination. One of the typical derivatization reactions for ATSs is silylation [19,38–40]. Although silylation reactions are not compatible with aqueous media, such inconvenience may be circumvented in SPME by performing first the extraction and subsequently the derivatization, by exposing the fiber to the vapors of the silylating agent

(on-fiber derivatization) [23,24,26,27]. Such derivatization strategy was tested, however, it produced unsatisfactory results (very low SPME extraction yields) because of the polar character of non-derivatized analytes (data not shown). An alternative in order to enhance the SPME extractability of amines and achieve their derivatization in a single step is the use of an acylation agent to produce the carbamate derivative [23,25,30,41–43], as that reaction is fast under basic pH conditions, even at room temperature. Among the different acylating agents, alkyl chloroformates have been proven as efficient reagents for SPME of ATSs from biological samples [29,43,44]. Thus, the simultaneous extraction and derivatization of ATSs with iBCF was considered in this work.

The reaction of ATSs with iBCF introduces an *iso*-butyl carbamate group in the molecule, resulting into an increase of 100 Da in the derivative respecting the molecular weight of the ATS. However, the molecular ion of those derivatives is not detected in the EI mass spectra or its abundance is very low (Fig. 1). Instead, the ionized molecule yields two intense ions due to its split in two parts. Hence, one of the ions produced corresponds to the aromatic radical ion, a benzyl ion in the case of AMP and MAMP, with m/z 91 (Fig. 1a), or the corresponding 3,4-methylenedioxy-benzyl ion, with m/z 135, characteristic of the three ecstasy derivatives (Fig. 1b). The second ion corresponds to the other part of the molecule, with an m/z value characteristic on the N-substituent: m/z 144 for AMP (Fig. 1a) and MDA, m/z 158 for MAMP and MDMA (Fig. 1b) and m/z 172 for MDEA. Other typical ions observed in the spectra are the *iso*-butyl ion (m/z 57) and those arising from the McLafferty rearrangement mediated loss of the *iso*-butyl group, as e.g. m/z 102 in the case of MDMA (Fig. 1b). The most abundant and specific m/z ions were employed for quantification, with two additional ions being recorded for confirmative purposes (one in the case of ISs) as summarized in Table 1.

3.2. Optimization of SPME

3.2.1. Selection of fiber coating and extraction mode

Several SPME methods for the determination of ATSs in urine samples have been proposed. The typical fiber coating used in the literature is PDMS [28–32,43,45,46]. In spite of the fact that the SPME coating plays a very relevant role in order to obtain the best extraction yield, this is a parameter not being typically considered in forensic analysis. However, the analysis of environmental samples requires a very demanding sensitivity. Therefore, in this work, four SPME fibers of different polarities were tested, viz. PDMS, PDMS-DVB, CAR-PDMS and PA. This was performed by direct SPME of 10 mL Milli-Q water samples spiked with 2 ng mL^{−1} of each analyte, 100 μL of iBCF (1:10) and 0.035 g of dipotassium monohydrogen phosphate trihydrate, into 10 mL vials. Each mixture was stirred at 400 rpm during 10 min prior to fiber introduction. Then, the SPME fiber was submerged in the sample for extraction during 40 min, under magnetic stirring, and finally introduced in the GC–MS injector (for 3 min at the temperature recommended by the manufacturer) for analytes desorption and determination. These experiments were carried out in triplicate with each type of fiber. As shown in Fig. 2, CAR-PDMS and PDMS-DVB fibers produced the best results, yielding similar areas for all analytes but MDEA. For that compound, the PDMS-DVB fiber produced a six-fold higher response than CAR-PDMS.

In a second assay, the two SPME modes, direct immersion and headspace (HS), were compared. Direct immersion was performed as describe above, while for HS-SPME experiments, the only differences were the use of a 20 mL vial, in order to have a ca. 10 mL headspace for the fiber to be exposed to the HS, and the fact that extraction was performed both at room temperature and at 100 °C in order to promote the migration of analytes to HS. Moreover, in the case of the HS mode, addition of NaCl (25%) was

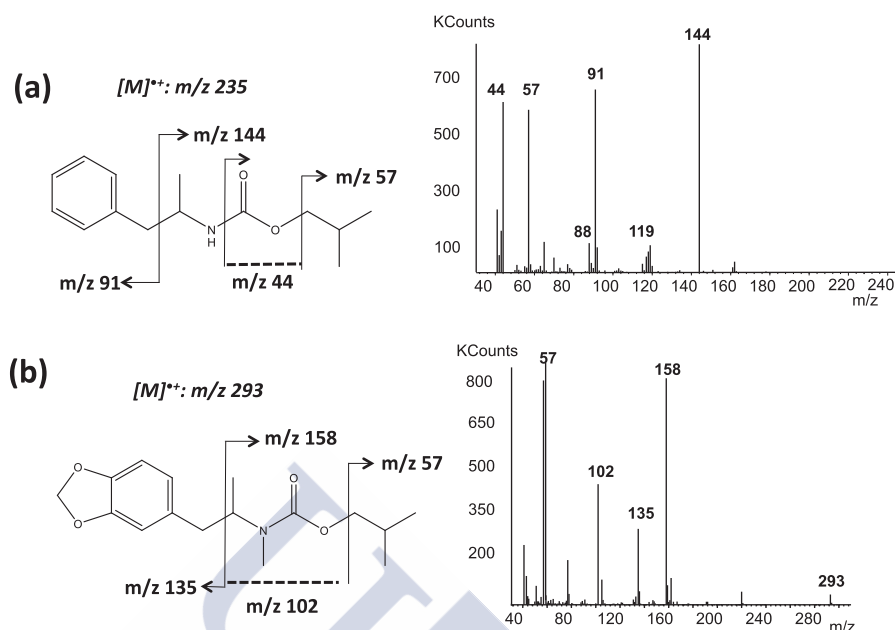


Fig. 1. EI-MS fragmentation pathway of (a) AMP and (b) MDMA derivatives.

also considered. These experiments were accomplished in triplicate with the previously identified two best fibers: PDMS-DVB and CAR-PDMS. The results of these experiments are presented in Fig. 3, excluding room temperature HS-SPME that provided very low responses. HS-SPME provided the best extraction yield for the lighter analytes, AMP and MAMP, with 1.2–2.8 times higher response than direct SPME, which even increased to ca. 5 times higher areas if NaCl is added. On the other hand, for ecstasy related ATs, direct SPME provides a 3–15 better yield than HS-SPME, without NaCl. This can be attributed to the lower vapor pressure of these analytes compared to AMP and MAMP. Addition of NaCl improved the efficiency of HS-SPME for these three ATs (Fig. 3), but still provided lower results than direct SPME for MDMA, and particularly MDA (ca. 7 times lower). However, the combination of NaCl and high temperatures in HS experiments resulted into the SPME fiber being degraded and even the steel needle being oxidized after some experiments, reducing fiber life and response over time and leading to worse reproducibility.

In view of these results, direct (immersion mode) SPME with the PDMS-DVB was selected for further optimization.

3.2.2. Optimization of aqueous derivatization SPME parameters

A Box-Behnken experimental design [47] was employed in order to simultaneously evaluate the effect of NaCl, buffer, and derivatization agent concentration. With this type of design, fifteen experiments (including three central points) were carried out according to the following experimental domain: 0–30% NaCl, 10–100 mM dipotassium monohydrogen phosphate, and 0.01–0.1% iBCF. A basic medium is necessary in order to catalyze the derivatization reaction, by increasing the pH at values higher than 9 [43,44]. Hydrogen carbonate or carbonate buffers are typically employed with chloroformate reagents for this purpose in the literature [29,32,43,44]. However, those buffers promote bubble formation

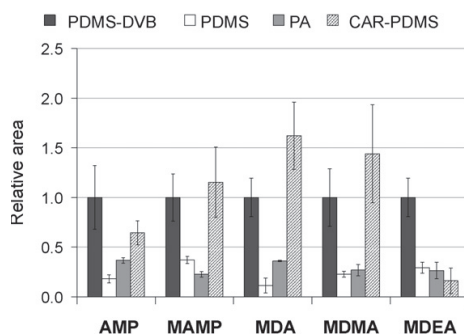


Fig. 2. Relative response obtained with the different SPME coatings ($n=3$, data normalized to the PDMS-DVB fiber).

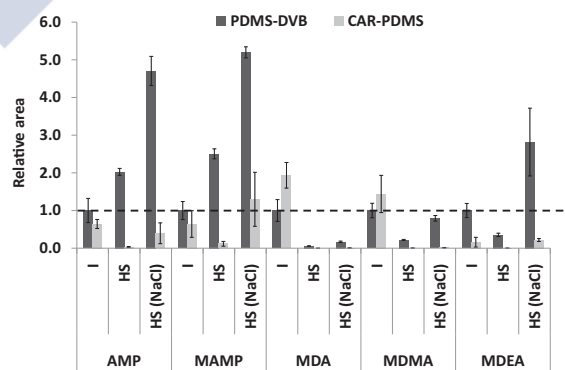


Fig. 3. Comparison of the areas obtained for direct immersion (I) SPME at room temperature, and head-space (HS) SPME at 100°C. HS-SPME was also performed with 25% NaCl ($n=3$, data normalized to direct SPME with PDMS-DVB).

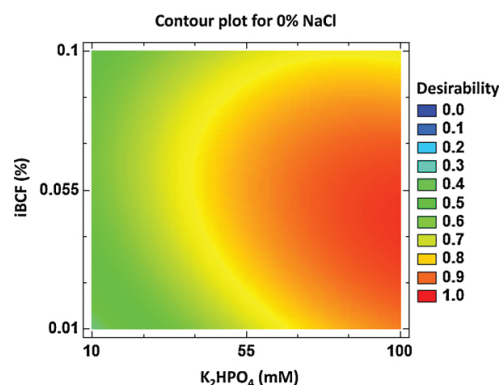


Fig. 4. Global desirability function plot.

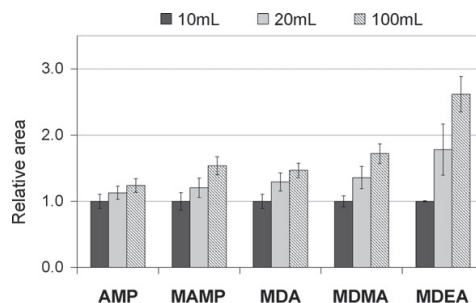
in the solution, due to the release of CO_2 , and, thus, a phosphate buffer was used instead, as it has proven as a good alternative [48].

All the experiments were carried out with 10 mL of influent wastewater samples (fortified at 2 ng mL^{-1} with the analytes), 10 min of pre-agitation and 40 min of direct SPME. A real wastewater sample was used in this case as we have previously observed that real samples may need higher amounts of buffer or derivatization agent, due to other organic substances present in real samples competing with the analytes [48].

The responses (peak area of each compound) were evaluated and the results are schematically presented in Table 2. The statistical analysis based on the standardized main effects and ANOVA (95% confidence level) [47] showed that NaCl was the most relevant factor, exerting a statistical significant negative effect on the response for all ATSS. Its second order term (AA) was also significant and positive, which means that the effect of NaCl is not linear but close to an exponential decay. Hence, it is clear that the increase of ionic strength reduces the extractability of these polar analytes. The phosphate concentration was positive for all analytes and statistically significant for AMP, MAMP and MDA, showing a significant curvature for AMP (Table 2). The last considered factor (%iBCF) was only statistically important for the amphetaminic compound, AMP and MAMP, being negative and not linear. Therefore, for both buffer and iBCF concentrations, the maximal responses are obtained at intermediate values. In the case of the buffer, this can be interpreted as a competition between the positive effect of increasing the basic catalyzer concentration and the salting-in effect, due to the increase of phosphate and potassium ions in solution. In the case of iBCF, the explanation is related to the aqueous solubility of this reagent, as, on the one hand, higher concentrations improve the derivatization but on the other hand, there is a point where iBCF is not further soluble in water, producing a small organic phase that competes with the SPME coating for the extraction of analytes.

Besides the main effects of each factor, relevant interactions were detected between salt and buffer concentrations (AB) for AMP, and between salt and iBCF concentrations (AC) for MDEA (Table 2). Those interactions are interpreted as a more relevant negative effect of NaCl at low concentrations of buffer or iBCF, for AMP and MDEA, respectively.

Given the complex behavior observed, a multiple response optimization strategy was performed in order to get the best compromise conditions, by means of a desirability function [47,49]. The maximum overall response (desirability = 0.95) was obtained with no salt addition, $100 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4$ and 0.045% of iBCF (Fig. 4). Yet, for practical considerations (easiness of pipetting and weighing) and no relevant difference in the value of desirability function

Fig. 5. Effect of the sample volume on the SPME response ($n = 3$, data normalized to 10 mL).

the finally selected operational parameters were: no salt addition, $87.6 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4$ (equivalent to 0.2 g of dipotassium monohydrogen phosphate trihydrate for 10 mL of sample) and 0.05% iBCF ($100 \mu\text{L}$ of iBCF (1:10)). Fig. 4 shows the overall desirability function plot (at 0% NaCl) where it can be observed that the desirability in this area is also good. Actually, the finally adopted conditions produce a desirability value of 0.93 .

Finally, the need of pre-stirring was evaluated by performing triplicated 40 min extractions under the previously optimized conditions, with and without the 10 min pre-stirring step. Both experiments provided no significant difference in the area of the derivatized ATSS (data not shown). Hence, the derivatization process between the analytes and iBCF occurs very fast or is completed in the fiber during extraction, as actually, no traces of underivatized compounds were detected in the chromatogram. Therefore, the pre-stirring time was not further employed, simplifying and speeding up the SPME procedure.

3.2.3. Sample volume

The effect of increasing the sample volume was investigated with 10 , 20 and 100 mL of Milli-Q samples spiked at the 2 ng mL^{-1} level with the analytes under the previously optimized conditions ($n = 3$) with an extraction time of 40 min . Those sample volumes were selected as to fit typical crimp cap vials keeping the headspace volume low. As shown in Fig. 5, although not proportional to the sample volume, the increase of sample volume results in higher amounts of ATSS extracted. Hence, the sensitivity gain was only moderate for the most polar analytes ca. 30% for AMP with 100 mL compared to 10 mL , but it was more important for the least polar ATSS: ca. 2.6 times higher response for MDEA (Fig. 5). Therefore, 100 mL were finally employed in order to decrease the LODs.

3.2.4. Temperature and extraction time

Bearing in mind the dependence between temperature and extraction kinetics, these factors were evaluated together. The extraction profile was studied by SPME of spiked Milli-Q water (200 ng L^{-1}) under the previously optimized conditions in the 20 – 240 min range at three temperatures: 22°C (room temperature), 60°C and 80°C . Thus, the results were fitted to Eq. (1) and the time needed to reach the equilibrium (t_{95}) calculated. The R^2 values obtained were higher than 0.9 , except for room temperature (Table 3). That was due to the fact that equilibrium is far from the maximum extraction time considered, so that predicted t_{95} for that temperature are only indicative values. In particular, in the case of MDEA, Eq. (1) parameters could not be calculated due to a very bad fit.

As expected for equilibrium extraction techniques, as SPME, an increase in the temperature resulted in less amount of analyte extracted (see A_{max} in Table 3), whereas the time to reach the

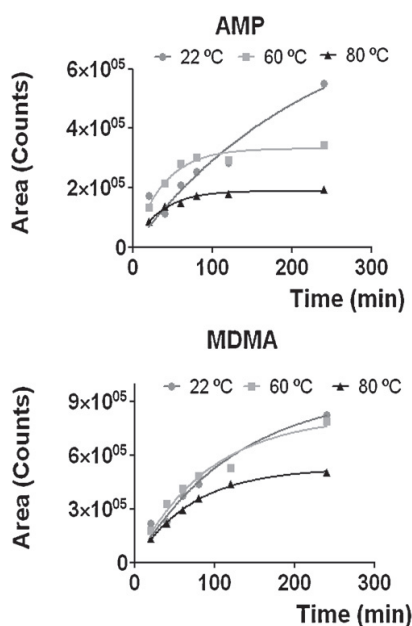


Fig. 6. SPME kinetic plots for AMP and MDMA at different extraction temperatures.

equilibrium decreased (t_{95} in Table 3) [37]. This is also exemplary presented in Fig. 6 for AMP and MDMA. However, it is clear that even at 80 °C the time needed to reach the equilibrium was longer than 1.5 h for all compounds and in that case the amount of polar analytes extracted would be much lower than at lower temperatures, even when the equilibrium is not reached (see the plot for AMP in Fig. 6). Hence, in order to keep a reasonable method throughput, the SPME time was fixed at 40 min (non-equilibrium SPME). This time is shorter than the chromatographic time, allowing one sample being prepared while the previous one is analyzed at the GC–MS. For that extraction time, the temperature selected was 60 °C, as it provides

the best extraction yield for all analytes as predicted from Eq. (1) and as it can be visualized for AMP and MDMA in Fig. 6.

3.2.5. Carry-over effect evaluation

The carry-over effect was tested by performing two consecutive fiber desorptions after the SPME of a Milli-Q sample spiked at a high concentration level (2 ng mL⁻¹). As no traces of the analytes were detected in the second desorption, it is evident that 3 min are enough for complete desorption of ATSS. However, SPME fibers were desorbed for three additional minutes before the next extraction, in order to assure the elimination of other matrix constituents that could remain on the fiber.

3.3. Method performance

3.3.1. Water samples

The different performance figures of the SPME–GC–MS method were evaluated. Thus, the linear range was studied by duplicated extractions in the LOQ–500 ng L⁻¹ range (ISs at 100 ng L⁻¹). As presented in Table 4, the determination coefficients (R^2) were higher than 0.994 for the whole set of analytes.

The precision was first evaluated by extractions of Milli-Q water ($n=6$) spiked at the 50 ng L⁻¹ level, providing RSD values between 2.7 and 7.1% (Table 4). The same study was repeated with river and wastewater samples spiked at 100 ng L⁻¹ ($n=4$), where the RSD values were still lower than 15% (Table 4). The precision obtained is comparable to data reported in SPE based methods. [6,11,14–16,18].

On the other hand, it is well known that SPME is susceptible of matrix effects, resulting in lower extraction efficiencies with real matrices than with model Milli-Q water [22]. Hence, the trueness of the method was studied by spiking river and wastewater (100 ng L⁻¹ of both analytes and ISs) and calculating the relative recoveries from the calibration in Milli-Q ($n=4$), after subtracting the amount of analytes detected in the unspiked samples. Relative recoveries, without IS correction, were close to 50% in the worst case, influent wastewater (data not shown) confirming the occurrence of matrix effects. However, the use of the isotopically labeled ISs granted the adequate trueness, with relative recoveries in the 84–114% range (Table 4). In general terms, it can be concluded

Table 2

Experimental domain of the Box–Behnken design and relative effects (positive or negative) of each factor and second order terms.

Factors	% NaCl (A)	K ₂ HPO ₄ mM (B)	% iBCF (C)	Second order terms					
Low level	0	10	0.01						
Central level	15	55	0.055						
High level	30	100	0.1						
AMP	– [*]	+	– [*]	AA	BB	CC	AB	AC	BC
MAMP	– [*]	+	– [*]	+	– [*]	– [*]	– [*]	+	–
MDA	– [*]	+	–	+	–	–	–	–	–
MDMA	– [*]	+	–	+	–	–	–	–	–
MDEA	– [*]	+	+	+	–	–	–	– [*]	–
Selected conditions	0	87.6	0.05						

^{*} Statistically significant factor (95% of confidence level).

Table 3

Kinetics fitting parameters of SPME at different temperatures. See Section 2.6 for details.

Compound	A_{max}			a			t_{95} (min)			R^2		
	22 °C	60 °C	80 °C	22 °C	60 °C	80 °C	22 °C	60 °C	80 °C	22 °C	60 °C	80 °C
AMP	8.2E+6	3.3E+6	1.9E+6	4.4E–3	2.7E–2	2.9E–2	684	111	100	0.87	0.96	0.98
MAMP	1.3E+6	1.0E+6	6.9E+5	7.5E–3	1.5E–2	1.8E–2	397	199	164	0.81	0.94	0.99
MDA	3.4E+6	1.8E+6	1.1E+6	6.0E–3	1.8E–2	2.1E–2	496	165	138	0.84	0.98	0.99
MDMA	9.6E+5	8.2E+5	5.2E+5	7.9E–3	1.1E–2	1.4E–2	377	273	214	0.97	0.96	0.99
MDEA	^a	9.1E+6	6.9E+6	^a	8.40E–3	8.9E–3	^a	356	333	^a	0.90	0.99

^a Not calculated due to poor fitting.

Table 4
SPME-GC–MS performance figures for environmental water samples.

Compound	R^2 ^a	LOD ^b (ng L ⁻¹)	LOQ ^b (ng L ⁻¹)	Relative recoveries ^c (%)			Precision ^d (% RSD)			
				Influent	Effluent	River	Milli-Q	Influent	Effluent	River
AMP	0.9940	2.0	6.8	103	91	111	7.1	6.8	0.7	2.5
MAMP	0.9976	0.5	1.7	84	105	95	2.9	14.2	3.1	1.4
MDA	0.9992	1.0	3.4	100	114	113	2.7	2.9	6.9	5.5
MDMA	0.9977	0.8	2.6	107	94	92	3.7	5.7	3.4	9.0
MDEA	0.9994	0.4	1.4	102	103	92	6.9	2.7	1.5	1.3

^a Calibration levels: 10, 20, 50, 100, 200, and 500 ng L⁻¹ (ISs: 100 ng L⁻¹).^b LOD and LOQ calculated as S/N = 3 and S/N = 10, respectively from influent wastewater.^c ISs corrected relative recoveries. Samples spiked at 100 ng L⁻¹ level ($n = 4$).^d Samples ($n = 4$) spiked at 100 ng L⁻¹ level, except Milli-Q water ($n = 6$, 50 ng L⁻¹).**Table 5**
SPME-GC–MS performance data for urine samples. N.B.: all concentrations are referred to undiluted urine.

Compound	R^2 ^a	LOD ^b (ng mL ⁻¹)	LOQ ^b (ng mL ⁻¹)	Relative recovery ^c (%)		Precision ^c (% RSD)	
				5 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹
AMP	0.9998	0.03	0.10	110	99	4.3	4.2
MAMP	0.9996	0.01	0.04	107	103	0.9	3.4
MDA	0.9998	0.09	0.30	100	101	2.1	4.0
MDMA	0.9996	0.04	0.15	105	98	2.4	5.1
MDEA	0.9980	0.02	0.06	111	107	2.7	10.2

^a Calibration levels: 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 and 500 ng mL⁻¹ (ISs: 50 ng mL⁻¹).^b LOD and LOQ calculated for S/N = 3 and S/N = 10, respectively.^c Internal standard corrected values ($n = 4$).

that these recoveries are comparable or superior to other published methods for ATSS determination in water [7,11–13].

LODs and LOQs were determined with spiked wastewater samples, for a signal to noise of 3 and 10, respectively. As presented in Table 4, LODs in the 0.4–2 ng L⁻¹ and LOQs in the 1.4–6.8 ng L⁻¹ were obtained (Table 4). These LODs are similar or better than those obtained by SPE-LC–MS [6,11–16]. In comparison with our previous work by SPE-GC–MS/MS [19], the LODs have been lowered between 3.5 and 30 times.

3.3.2. Urine samples

Given that the determination of ATSS in biological fluids is also a topic of current interest, the developed SPME method was also validated with urine samples. In this case, as the LODs are not so demanding as compared to wastewater, 1 mL of urine was diluted to 10 mL with Milli-Q in 10 mL vials, the IS concentration was adjusted to 50 ng mL⁻¹ (all concentrations in this section are referred to undiluted urine), while the remaining SPME conditions remained the same (but scaled to 10 mL, see Section 2.4). The figures of merit obtained for urine samples are compiled in Table 5 and a chromatogram of a urine sample spiked with 5 ng mL⁻¹ of ATSS (50 ng mL⁻¹ of ISs) is presented in Fig. 7.

The examination of the linear range between the LOQ and 500 ng mL⁻¹ showed R^2 values higher than 0.998. Also, the LODs and LOQs obtained from urine samples are lower or equal than 0.09 ng mL⁻¹ and 0.3 ng mL⁻¹, respectively (Table 5). The precision and trueness were studied at two spike levels (5 and 50 ng mL⁻¹; $n = 4$). The matrix effects in urine, respecting calibration in Milli-Q, resulted into a ca. 50% signal reduction (data not given). However, these matrix effects were again compensated with the ISs, producing relative recoveries in the 98–111% range and RSD values below 11% (Table 5). Hence, matrix-matched calibration is not necessary and the SPME method has proven to be applicable to urine samples. The LODs obtained for ATSS in this work are comparatively better than most of the SPME published methods, where LODs round 100 ng mL⁻¹ [33–35], some authors report LODs around 0.1–10 ng mL⁻¹ [28,29,31,50] and only one publication provides LODs comparable to those obtained in this work [30]. Relative recoveries and precision are also comparable or better than other

published methods based on SPME [28–31,33–35,50]. The only disadvantage of the method presented in this work is the higher extraction time, but it could be reduced by moderately sacrificing sensitivity.

3.4. Application to real water samples

Finally, the analytical method was applied to real environmental samples. Thus, four grab samples were taken at the input and output of a WWTP and two additional samples were collected in a river which receives the effluents of the WWTP ca. 5 km downstream of the discharge point. AMP and MDA were not detected in any of the analyzed samples. The remaining analytes concentrations are presented in Table 6. As shown, MDMA was present in all the wastewater samples, without substantial concentration

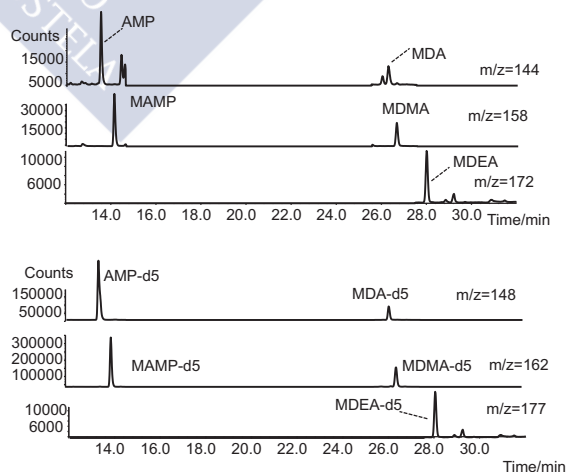
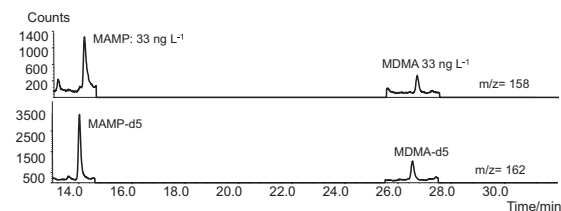


Fig. 7. Extracted ion chromatogram of a urine sample spiked at 5 ng mL⁻¹ with the analytes (50 ng mL⁻¹ of ISs).

Table 6Concentrations (ng L⁻¹) of ATSS found in water samples (n = 3) expressed as mean ± standard deviation. AMP and MDEA were below LODs in all samples.

Compound	Influent wastewater				Effluent wastewater				River	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
MAMP	8.9 ± 0.3	29 ± 3	<LOD	22 ± 2	<LOD	33 ± 2	17.4 ± 0.9	<LOD	<LOD	<LOD
MDA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	40 ± 6	<LOD	<LOD	<LOD	39 ± 4	<LOD
MDMA	19 ± 2	25.7 ± 0.6	16.6 ± 0.6	12.4 ± 0.5	18 ± 1	33.1 ± 0.9	22.3 ± 0.8	16.0 ± 0.8	<LOD	12.2 ± 0.4

**Fig. 8.** Extracted ion chromatogram of an effluent wastewater sample (no. 2 in Table 6) showing the quantification ion of the detected analytes and their internal standards.

difference between the effluent and influent (12–33 ng L⁻¹). Moreover, this ATS was detected in one of the river samples at 12 ng L⁻¹, while it was below the LOD in the other one. These results are in line with Baker and Kasprzyk-Holdern [51] who measured similar concentrations of MDMA in effluents and influents in the UK. The second compound most frequently detected was MAMP, detected in about 50% of the wastewater samples up to 33 ng L⁻¹, but not found in river samples. Finally MDA was detected only in one of the effluents and one of the river samples. As an example, Fig. 8 shows the selected ion chromatogram of MAMP and MDMA in an effluent wastewater sample. In general, the concentrations are in the range of those reported in the literature [9].

4. Conclusions

This work presents the first SPME-GC-MS method for the trace determination of ATSS in water samples. Derivatization was performed with an alkyl chloroformate (iBCF), permitting the aqueous reaction of ATSS and enhancing their extractability and GC-MS determination. The main advantages of the method are their good performance figures, including LODs ≤ 2 ng L⁻¹, those inherent of SPME, such as the low consumption of solvents and its easy automation and the fact that GC-MS is used, which is more widely available than LC-MS(/MS) in research and non-research laboratories. On the other hand, its major drawback is that it is focused to a single class of drugs of abuse, while SPE-LC-MS(/MS) methods can be used for multiresidue analysis, sacrificing performance for some analytes. Moreover the method was also validated with urine samples producing excellent figures of merit, including LODs lower than those reported in the bibliography.

Acknowledgements

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (*Ministerio de Economía y Competitividad*) and FEDER funds through: Project nos. CTQ2009-08377 and CTQ2010-18927; FPI grant (awarded to Inés Racamonde) and Ramón y Cajal research program (awarded to Rosario Rodil and José Benito Quintana). We are also grateful to Aquagest for providing access to wastewater samples.

References

- [1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) Annual Report 2011, EMCDDA, Luxembourg, 2011.
- [2] S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli, *Illicit Drugs in the Environment: Occurrence, Analysis and Fate Using Mass Spectrometry*, Wiley, New Jersey, 2011.
- [3] R.C. Balset, *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, Biomedical Publications, Seal Beach, CA, 2004.
- [4] P. Vázquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2851–2864.
- [5] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, C. Chiabrando, P. Grassi, R. Fanelli, *Water Res.* 42 (2008) 961–968.
- [6] L. Bilsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibáñez, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3078–3089.
- [7] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3821–3829.
- [8] M. Huerta-Fontela, O. Pineda, F. Ventura, M.T. Galcerán, *Water Res.* 46 (2012) 3304–3314.
- [9] R. Pal, M. Megharaj, K.P. Kirkbride, R. Naidu, *Sci. Total Environ.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.086>, in press.
- [10] T.H. Boles, M.J.M. Wells, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2561–2568.
- [11] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3123–3134.
- [12] S. Karolak, T. Nefau, E. Bailly, A. Solgadi, Y. Levi, *Forensic Sci. Int.* 200 (2010) 153–160.
- [13] S. Terzic, I. Senta, M. Ahel, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2686–2693.
- [14] S. Castiglioni, E. Zuccato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8421–8429.
- [15] I. González-Marín, J.B. Quintana, I. Rodríguez, M. González-Díez, R. Cela, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1708–1717.
- [16] A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 819–828.
- [17] C. Metcalfe, K. Tindale, H. Li, A. Rodayan, V. Yargeau, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3179–3185.
- [18] I. González-Marín, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Rodil, J. González-Peñas, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8435–8441.
- [19] I. González-Marín, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1217 (2009) 1748–1760.
- [20] S. Castiglioni, E. Zuccato, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Mass Spectrom. Rev.* 27 (2008) 378–394.
- [21] Ó.J. Pozo, J.V. Sancho, M. Ibáñez, F. Hernández, W.M.A. Niessen, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 1030–1042.
- [22] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [23] J.B. Quintana, I. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1447–1461.
- [24] I. Racamonde, E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1245 (2012) 167–174.
- [25] P.C.F.D.L. Gomes, J.Y. Barletta, C.E.D. Nazario, A.J. Santos-Neto, M.A. Von Wolff, C.M.R. Coneglian, G.A. Umbuzeiro, F.M. Lancas, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 436–445.
- [26] I. Rodríguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 1–8.
- [27] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 179–185.
- [28] C. Jurado, M.P. Giménez, T. Soriano, M. Menéndez, M. Repetto, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 11–16.
- [29] A. Namera, M. Yashiki, T. Kojima, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 19–22.
- [30] K.-J. Chia, S.-D. Huang, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 49–54.
- [31] M.-K. Huang, C. Liu, S.-D. Huang, *Analyst* 127 (2002) 1203–1206.
- [32] N. Raikos, K. Christopoulou, G. Theodoridis, H. Tsoukali, D. Psaroulis, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 59–63.
- [33] S.D. Brown, D.J. Rhodes, B.J. Pritchard, *Forensic Sci. Int.* 171 (2007) 142–150.
- [34] C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 328–335.
- [35] C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 1209–1217.
- [36] S. Seidi, Y. Yamini, T. Baheri, R. Feizbakhsh, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3958–3965.
- [37] Y. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5807–5815.
- [38] J.Y. Kim, J.C. Cheong, M.K. Kim, J.I. Lee, M.K. In, *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 805–813.
- [39] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 359–364.
- [40] F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 231–238.
- [41] J.P. Lamas, C. Salgado-Petinal, C. García-Jares, M. Llompart, R. Cela, M. Gómez, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 241–247.

- [42] M. Yonamine, N. Tawil, R.L.d.M. Moreau, O.A. Silva, J. Chromatogr. B 789 (2003) 73–78.
- [43] H.G. Uglund, M. Krogh, K.E. Rasmussen, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 463–475.
- [44] H.G. Uglund, M. Krogh, K.E. Rasmussen, J. Chromatogr. B 701 (1997) 29–38.
- [45] F. Centini, A. Masti, I.B. Comparini, Forensic Sci. Int. 83 (1996) 161–166.
- [46] M. Yashiki, T. Kojima, T. Miyazaki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki, K. Hara, Forensic Sci. Int. 76 (1995) 169–177.
- [47] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [48] E. Villaverde-de-Sáa, I. González-Mariño, J.B. Quintana, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 2559–2568.
- [49] J.B. Quintana, R. Rodil, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1283–1293.
- [50] J. Zeng, J. Zou, X. Song, J. Chen, J. Ji, B. Wang, Y. Wang, J. Ha, X. Chen, J. Chromatogr. A 1218 (2012) 191–196.
- [51] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1620–1631.



METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE FÁRMACOS

En este apartado se incluyen los siguientes artículos:

Publication III.3:

“DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES, RELATED PHARMACEUTICALS AND METABOLITES IN WATER BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND LIQUID-CHROMATOGRAPHY–TANDEM MASS SPECTROMETRY”.

Inés Racamonde, Rosario Rodil, José Benito Quintana, Eugenia Villaverde-de-Sáa, Rafael Cela.

Journal of Chromatography A 1352 (2014) 69-79

Publication III.4:

“ASSESSMENT OF POLYPROPYLENE TUBES AS SINGLE-USE AND LOW-COST SORPTIVE EXTRACTION MATERIALS FOR THE DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES AND ZOLPIDEM IN WATER SAMPLES”.

Inés Racamonde, José Benito Quintana, Rosario Rodil, Rafael Cela.

Microchemical Journal 119 (2015) 58–65

Publication III.5:

“FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION: A NEW SORPTIVE MICROEXTRACTION TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS FROM ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES”.

Inés Racamonde, Rosario Rodil, José Benito Quintana, Benigno José Sieira, Abuzar Kabir, Kenneth G. Furton, Rafael Cela.

Analytical Chimica Acta 832 (2015) 22-30





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography–tandem mass spectrometry



Inés Racamonde, Rosario Rodil, José Benito Quintana*, Eugenia Villaverde-de-Sáa, Rafael Cela

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, IIAA-Institute for Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela, R/Constantino Candeira SN, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2014

Received in revised form 22 May 2014

Accepted 26 May 2014

Available online 2 June 2014

Keywords:

Benzodiazepines

Methylphenidate

Ritalinic acid

Solid-phase extraction (SPE)

Liquid chromatography–mass

spectrometry (LC–MS/MS)

Wastewater analysis

ABSTRACT

This work presents a method for the simultaneous determination of 23 benzodiazepines, metabolites and related pharmaceuticals (zolpidem, methylphenidate and ritalinic acid) by solid-phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). Different SPE cartridges were considered: hydrophilic modified reversed-phase (Oasis HLB) and their modified versions containing also a cationic-exchange group (Oasis MCX) or anionic-exchange (Oasis MAX) functionalities. Stability of analytes and the impact of the final eluate volume on the matrix effects on LC–MS/MS were also considered. In the final method, 100–200 mL of sample are extracted with Oasis MCX (60 mg), eluted with 5 mL of methanol (1.25% NH_3) and the eluate concentrated and analyzed by LC–MS/MS. Under these conditions, LOQs were established between 0.1 and 18 ng L^{-1} for influent wastewater. The use of surrogate deuterated internal standards allows obtaining recoveries in the 84–122% range. Finally the method was applied to determinate the analytes in wastewater and surface water and 10 compounds were detected in the range of $0.5\text{--}170 \text{ ng L}^{-1}$, being the ritalinic acid (the main metabolite of methylphenidate) the analyte detected in the highest concentrations.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Benzodiazepines (BZPs) are pharmaceuticals prescribed for stress or panic situations, dream disorders, against muscular injuries and, recently, in drug-addiction detoxification programs [1]. It is well documented that one of the main disadvantages of the long-term BZPs use is the risk of dependence, accidents, faints and cognitive disturbance [2,3]. In the period 2000–2007, the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Health Data [4] put the Spanish consumption of anxiolytics a 37% higher than the European average: 43 Defined Daily Doses (DDD) per 1000 inhabitants and day vs. $31.4 \text{ DDD } 1000 \text{ inh.}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (European mean). Only Portugal ($72 \text{ DDD inh.}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and France ($57 \text{ DDD inh.}^{-1} \text{ day}^{-1}$) were higher. In the case of sedative-hypnotics usage, Spanish prescription ($21.0 \text{ DDD inh.}^{-1} \text{ day}^{-1}$) is very close to the EU average ($28.9 \text{ DDD inh.}^{-1} \text{ day}^{-1}$). Anyway, the consumption of anxiolytics and sedative-hypnotics keeps raising and Spanish

national surveys indicated a consumption of $89 \text{ DDD inh.}^{-1} \text{ day}^{-1}$ in 2012, representing a 22% increment respecting the data of 2007 [5].

However, besides therapeutic usage, recreational and illicit use of BZPs has been recently reported by The European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) where BZPs have a high presence in situations of sexual assaults mediated by drugs or alcohol [6,7], or also between the younger population in order to increase the effect of illicit drugs [7]. Zolpidem (ZOLP) and methylphenidate (MPHEN) are other therapeutic drugs involved in such usage pattern. Though they are not BZPs themselves, they act over the same brain receptor. Actually, ZOLP has a very similar chemical structure to some BZPs with the presence of an imidazopyridine ring. ZOLP is prescribed against insomnia situations and because of this it is reported in the same therapeutic group (N05C-hypnotics) as some of the most commonly prescribed BZPs, e.g. bromazepam (BROM), lorazepam (LORM) and midazolam (MID) among others [8]. MPHEN is a psycho-stimulant drug used for the treatment of narcolepsy and the attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). It shares with the BZP the same brain receptor for its action, although the effect is completely the opposite. The

* Corresponding author. Tel.: +34 881814263/881816035; fax: +34 881816027.
E-mail address: jb.quintana@usc.es (J.B. Quintana).

secondary effects of MPHEN include hallucinations, amnesia and effects similar to cocaine [9,10]. Because of this, it is a substance prone to an illicit usage. Hence, the determination of ZOLP, MPHEN and its main metabolite, ritalinic acid (RIT) are included in this work, together with BZPs and their metabolites.

Besides constituting a potential health issue, they may also be an environmental problem, since BZPs have been detected at the ng L^{-1} level in wastewater [11–14] and surface water [14–17], and can be also infiltrate into the subsoil and contaminate aquifers [18–20].

The most frequently used technique for their determination of BZPs and related compound in environmental samples is liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) [11,13,14,17–21] due to the chemical structure of these target analytes (benzene diazepine fused rings), which confers them a thermolabile and a polar character. Thus, determination by gas chromatography (GC) is less frequent since a derivatization reaction has to be performed to decrease their polar character and to obtain a good sensitivity and sometimes that it is not enough to achieve the limits of quantification (LOQs) required for their determination in wastewater and environmental waters [22,23]. Enrichment is typically performed by solid-phase extraction (SPE), mostly employing Oasis MCX [11,18] and Oasis HLB [13,24,25] cartridges. However, published methods to date simply considered the determination of a few BZPs, mainly diazepam (DIA), alprazolam (ALP), lorazepam (LOR) and oxazepam (OXA), together with other pharmaceutical classes, illicit drugs and related compounds.

Hence, the goal of this work was the development of a new analytical method capable of determining a broad range of BZPs, metabolites and related drugs (ZOLP, MPHEN and RIT) in environmental waters. Thus, 23 analytes are considered here. SPE and LC–tandem MS (LC–MS/MS) determination conditions were carefully optimized to achieve the adequate limits of detection (LODs) and LOQs. Then, the method was validated and applied to the determination of these drugs in wastewater and surface water.

2. Experimental

2.1. Materials and chemicals

ALP, α -hydroxyalprazolam (AHALP), α -hydroxytriazolam (AHTRI) clonazepam (CLON), 7-aminoclonazepam (7ACLON), flunitrazepam (FLUN) 7-aminoflunitrazepam (7AFLUN), flurazepam (FLUR), 2-hydroxyethylflurazepam (2HEFLU), DIA, nordiazepam (NDIA), LOR, LORM, MID, OXA, temazepam (TEM), MPHEN HCl salt, RIT HCl salt, BROM, chlordiazepoxide (CHLOR), demoxepam (DEM), prazepam (PRAZ) and ZOLP tartrate were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) as 1 mg mL^{-1} solutions in methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN). All concentrations cited herein refer to the neutral species. AHALP- d_5 , ALP- d_5 , 7ACLON- d_4 , 7AFLUN- d_7 , DIA- d_5 , FLUN- d_7 , NDIA- d_5 , OXA- d_5 , 2HEFLU- d_4 , LOR- d_4 , ZOLP- d_6 , RIT- d_{10} and MPHEN- d_9 , used as surrogate internal standards (ISs), were purchased also from Cerilliant (0.1 mg mL^{-1} in MeOH or ACN). A summary of the abbreviations, structures and selected physico-chemical properties of the analytes is presented in Table 1.

LC-grade MeOH, hydrochloric acid (37%), glacial acetic acid (100%), and formic acid (98–100%) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) whereas methanolic ammonia solution (6N), ammonium acetate (99.99%) and formic acid (98%) were supplied by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ultrapure water was obtained in the laboratory by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A-10 system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Oasis HLB (60 mg), Oasis MCX (60 mg) and Oasis MAX SPE cartridges (60 mg) were all purchased from Waters (Milford, MA, USA).

Nitrocellulose filters (size pore of 0.22 and 0.45 μm) and glass fiber pre-filters were purchased from Millipore.

2.2. Solutions

Mixed stock solution of the compounds were prepared by dilution of the individual stock solution to obtain a concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol. This solution was further diluted with methanol/water (50:50, v/v) to obtain a solution of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Subsequent dilutions with methanol/water (50:50, v/v) were prepared to obtain the suitable concentration to spike water samples and for calibration standards. The same dilution process was performed with the deuterated standards.

All the solutions were stored at -20°C in amber glass vials and, although no symptoms of degradation were observed, solutions were renewed after 2 months.

2.3. Samples

Grab wastewater samples of influent and effluent were obtained from a wastewater treatment plant (WWTP) serving an urban population around 130,000 inhabitants, located in the northwest of Spain. The WWTP consists of a primary and secondary activated sludge treatment. Surface water samples were collected in a river, approximately 5 km downstream the discharge point of the WWTP.

Samples were collected in 2.5 L amber glass bottles previously washed with methanol and ultrapure water and rinsed with the sample. They were filled up completely and stored at 4°C in the fridge and analyzed prior 12 h after sampling. Before analysis, samples were firstly filtered through a glass pre-filter and finally with a 0.45 μm nitrocellulose filter (Millipore, Milford, MA, USA).

2.4. Solid-phase extraction procedure

Different experimental conditions were evaluated (pH, sample volume etc.) during SPE method development, as explained in Section 3.4. A short general description is presented, however, here of the general protocol followed with the three SPE cartridges considered.

2.4.1. Oasis HLB protocol

Oasis HLB 60 mg cartridges were sequentially conditioned with 3 mL of MeOH and 3 mL of ultrapure water. Then the sample was percolated through the cartridge assisted by a vacuum pump at ca. 5 mL min^{-1} . Subsequently, the cartridges were washed with 6 mL of ultrapure water and vacuum dried for 20 min. Finally, compounds were eluted with 5 mL of MeOH, nitrogen-stream concentrated to a final determinate volume and analyzed.

2.4.2. Oasis MAX protocol

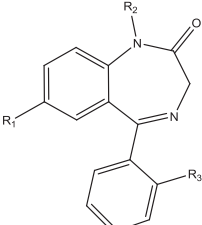
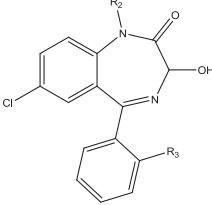
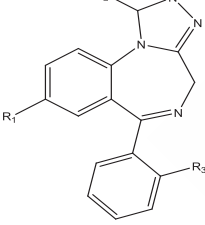
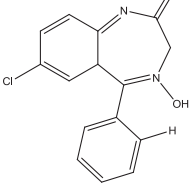
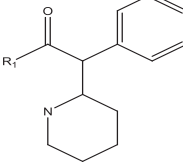
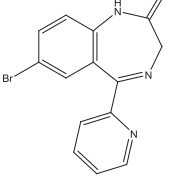
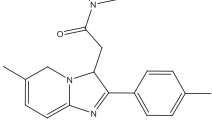
Oasis MAX 60 mg cartridges were sequentially conditioned with 3 mL of MeOH (2% formic acid), 3 mL of MeOH and 3 mL of ultrapure water. Samples were percolated at ca. 5 mL min^{-1} and then, cartridges were washed with 6 mL of ultrapure water and vacuum dried for 20 min. Finally compounds were eluted with 5 mL of MeOH (fraction 1) and 5 mL of MeOH containing 2% formic acid (fraction 2). Fractions were collected in separate vials, nitrogen-stream concentrated to a final determinate volume and analyzed separately.

2.4.3. Oasis MCX protocol

Oasis MCX 60 mg cartridges were sequentially conditioned with 3 mL of MeOH (1.25% NH_3), 3 mL of MeOH and 3 mL of ultrapure water. Samples were percolated at ca. 5 mL min^{-1} and the cartridges were washed with 6 mL of ultrapure water and vacuum dried for 20 min. Finally compounds were eluted with 5 mL

Table 1

Structure and physico-chemical properties of the studied BZPs and related pharmaceuticals. Data of $\log K_{ow}$ and pK_a were compiled from scifinder.cas.org (calculated using advanced chemistry development, ACD/Labs Software V11.02).

Structure	Compound (abbreviation)	R ₁	R ₂	R ₃	CAS	Formula	$\log K_{ow}$	pK_a
	Nordiazepam (NDIA)	H	H	Cl	1088-11-5	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	2.93	11.72
	Clonazepam (CLON)	NO ₂	H	Cl	1622-61-3	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₂ O ₃	2.37	11.21
	Flunitrazepam (FLUN)	NO ₂	CH ₃	F	1622-62-4	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	2.06	12.38
	7-Aminoclonazepam (7ACLON)	NH ₂	H	Cl	4959-17-15	C ₁₅ H ₁₂ ClN ₃ O	2.34	13.93
	7-Aminoflunitrazepam (7AFLUN)	NH ₂	CH ₃	F	34084-50-9	C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O	1.72	9.94
	Diazepam (DIA)	Cl	CH ₃	H	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	2.82	11
	Flurazepam (FLUR)	Cl	CH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂	F	17617-23-1	C ₂₁ H ₂₃ ClFN ₃ O	3.92	9.79
	2-Hydroxy-ethyl flurazepam (2HEFLU)	Cl	CH ₂ CH ₂ OH	F	20971-53-3	C ₁₇ H ₁₄ ClFN ₂ O ₂	2.49	14.42
	Prazepam (PRAZ)	Cl	CH ₂ CHCH ₂ CH ₂	H	2955-38-6	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O	3.73	10.55
	Oxazepam (OXA)	–	H	H	604-75-1	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	2.24	10.94
	Lorazepam (LOR)	–	H	Cl	846-49-1	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	2.39	10.80
	Temazepam (TEM)	–	CH ₃	H	846-50-4	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	2.19	11.66
	Lormetazepam (LORM)	–	CH ₃	Cl	848-75-9	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₂	2.23	11.60
	Alprazolam (ALP)	Cl	CH ₃	H	28981-97-7	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	2.37	11.6
	α-Hydroxy-alprazolam (AHALP)	Cl	CH ₂ OH	H	37115-43-8	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄ O	1.52	12.90
	Midazolam (MID) ^a	Cl	CH ₃	F	59467-70-8	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	4.33	7.67
	α-Hydroxy-triazolam (AHTRI)	Cl	CH ₂ OH	Cl	37115-45-0	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ NO	2.04	12.90
	Chlordiazepoxide (CHLOR)	–	NCH ₃	–	58-25-3	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O	2.05	11.39
	Demoxepam (DEM)	–	O	–	963-39-3	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	1.49	10.27
	Ritalinic acid (RIT)	OH	–	–	19395-41-6	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂	1.8	3.5
	Methylphenidate (MPHEN)	CH ₃	–	–	113-45-1	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	2.31	9.51
	Bromazepam (BROM)	–	–	–	1812-30-2	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O	2.05	11.39
	Zolpidem (ZOLP)	–	–	–	82626-48-0	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	3.09	7.23

^a In the case of MID there is a C atom in place of the N atom in position 2 of the triazole ring in the generic structure shown; i.e. MID is an imidazole instead of triazole.

Table 2
LC–MS/MS determination parameters.

Compound	ISs	<i>t_r</i> (min)	MRM transition	
			Quantifier ^a	Qualifier ^a
RIT	RIT- <i>d</i> ₁₀	2.92	220.0(48) → 84(15)	220.0(48) → 174(16)
7ACLON	7ACLON- <i>d</i> ₇	3.00	286.2(80) → 121(23.5)	286.2(80) → 222(19.5)
MPHEN	MPHEN- <i>d</i> ₉	3.78	234.1(48) → 84(15.5)	234.1(48) → 91(35.5)
7AFLUN	7AFLUN- <i>d</i> ₇	3.93	284.3(76) → 135(21.5)	284.3(76) → 227(18)
ZOLP	ZOLP- <i>d</i> ₆	5.83	308.4(92) → 235(28)	308.4(92) → 263(20.5)
DEM	FLUN- <i>d</i> ₇	6.62	287(72) → 269(23.5)	287(72) → 124(32)
BROM	FLUN- <i>d</i> ₇	7.09	318(72) → 182(28)	318(72) → 209(20.5)
CHLOR	NDIA- <i>d</i> ₅	7.21	300(56) → 281.9(21.5)	300(56) → 282.9(13)
FLUR	NDIA- <i>d</i> ₅	8.24	388.4(72) → 314.8(17.5)	388.4(72) → 317(13.5)
MID	ALP- <i>d</i> ₅	8.36	326.3(96) → 291(21.5)	326.3(96) → 249(28)
CLON	ALP- <i>d</i> ₅	8.94	316(84) → 270(22.5)	316(84) → 214(34)
AHTRI	ALP- <i>d</i> ₅	9.37	359(80) → 331(24.5)	359(80) → 176(22)
AHALP	AHALP- <i>d</i> ₅	9.61	325.3(88) → 216(36.5)	325.3(88) → 297(23)
FLUN	FLUN- <i>d</i> ₇	10.41	314(80) → 268(23)	314(80) → 239(31)
OXA	OXA- <i>d</i> ₅	10.8	287.3(32) → 241(21.5)	287.3(32) → 269(12)
2HEFLU	2HEFLU- <i>d</i> ₄	12.34	333.3(84) → 109(23)	333.3(84) → 315(12.5)
LOR	LOR- <i>d</i> ₄	12.34	321(56) → 274.9(18.5)	321(56) → 302.9(11.5)
ALP	ALP- <i>d</i> ₅	12.42	309(80) → 205(37.5)	309(80) → 281(23)
TEM	7AFLUN- <i>d</i> ₇	12.78	301.3(52) → 254.9(19.5)	301.3(52) → 283(12)
LORM	MPHEN- <i>d</i> ₉	14.66	335(52) → 288.9(18)	335(52) → 317(11)
NDIA	NDIA- <i>d</i> ₅	14.72	271.2(84) → 140(22)	271.2(84) → 165(21.5)
DIA	DIA- <i>d</i> ₅	18.05	285.2(80) → 153.9(20.5)	285.2(80) → 193(25)
PRAZ	MPHEN- <i>d</i> ₉	23.22	325.3(68) → 271(17.5)	325.3(68) → 140(32)
RIT- <i>d</i> ₁₀		2.86	230(48) → 93(15)	
7ACLON- <i>d</i> ₇		2.95	290(80) → 121(23.5)	
MPHEN- <i>d</i> ₉		3.75	243(48) → 93(15)	
7AFLUN- <i>d</i> ₇		3.05	291(76) → 227(18)	
ZOLP- <i>d</i> ₆		5.71	314(92) → 235(28)	
AHALP- <i>d</i> ₅		9.36	330(88) → 221(36.5)	
FLUN- <i>d</i> ₇		9.49	321(80) → 275(23)	
OXA- <i>d</i> ₅		10.6	292(32) → 246(21.5)	
2HEFLU- <i>d</i> ₄		12.22	337(84) → 113(23)	
LOR- <i>d</i> ₄		11.29	327(56) → 281(18.5) ^b	
ALP- <i>d</i> ₅		12.39	314(80) → 286(23)	
NDIA- <i>d</i> ₅		14.3	276(84) → 140(22)	
DIA- <i>d</i> ₅		17.7	290(80) → 198(25)	

^a *m/z* precursor ion (capillary voltage/V) → *m/z* product ion (collision energy/V).^b The [M+H+2]⁺ ion (with one ³⁷Cl atom) was used to avoid crosstalk with LOR due to their dichlorinated structure.

of MeOH (fraction 1) and then with 5 mL of MeOH (1.25% NH₃) (fraction 2). Fractions were collected in separate vials, nitrogen-stream concentrated to a final determinate volume and analyzed separately.

Under the finally optimized conditions, the Oasis MCX protocol was employed with the following modifications. Deuterated internal standards were added to the sample (100 ng L⁻¹) before the filtration step. Sample volume was adjusted to 200 mL for effluent wastewater and surface water, and 100 mL for influent samples. Elution was simply performed with 5 mL of MeOH (1.25% NH₃) and the eluate was evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted with 100 µL of MeOH and stored at -20 °C until analyzed by LC–MS/MS.

2.5. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

The liquid chromatograph was composed by two high-pressure mixing pumps (Varian, Walnut Creek, CA, USA), a vacuum membrane degasser (Metachem Technologies, Bath, UK), an autosampler and a thermostatic column compartment module (Varian). The LC-instrument was coupled to a Varian 320-MS triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI). Nitrogen, used as nebulizing and drying gas, was provided by a nitrogen generator (Domnick Hunter, Durham, UK). Argon (99.999%) was used as collision gas.

The MS was operated in the positive ESI mode. The ionization source working parameters were as follows: needle voltage 5000 V, ionization source temperature 50 °C, drying gas temperature (N₂) 200 °C, nebulizer gas pressure (N₂) 55 psi, drying gas pressure (N₂) 20 psi, collision gas pressure (Ar) 1.5 mTorr and centroid mode for acquisition. The resolution of the first and last quadrupoles was adjusted to 1.8 and 1.5 amu respectively. Instrument control and data acquisition were performed with the Varian MS Workstation 6.9 software.

A 100 mm × 2.0 mm with 4 µm particle diameter and 80 Å of pore size Synergi Fusion RP column (Phenomenex, CA, USA) was used. The column was protected with a 4 mm × 2 mm guard cartridge of the same stationary phase (Phenomenex). Column temperature was maintained at 35 °C. Injection volume was set to 10 µL. Analytes were separated using a flow rate of 0.2 mL min⁻¹ of a mixture of water (A) and MeOH (B), both containing 0.1% of acetic acid. The eluent gradient was as follows: initial conditions (40% B), 0–20 min (linear gradient to 50% B); 20–21 min (linear gradient to 100% B), 21–24 min (isocratic at 100% B) and finally return to the initial conditions of 40% B in 1 min with 5 additional minutes for column back-equilibration. Total runtime is 29 min, including column re-equilibration.

Determination of BZPs was performed by recording two multiple reaction monitoring mode (MRM) transitions for each analyte and just one for ISs. Specific transitions, collision energies and capillary voltages are listed in Table 2.

2.6. Matrix effects and effective concentration factor

The presence of organic matter and other matrix compounds in wastewater samples leads to matrix effects (normally signal suppression) in LC–MS/MS, particularly when the ionization source is ESI [26]. In this work, matrix effects were defined according to Eq. (1) as %ME [27,28]. Hence, a value of ME = 100% indicates no matrix effects, lower values signal suppression and higher values signal enhancement.

$$\%ME = \frac{\text{Response}_{\text{spiked sample}} - \text{Response}_{\text{unspiked sample}}}{\text{Response}_{\text{methanolic standard}}} \times 100 \quad (1)$$

Matrix effects are highly dependent on the concentration factor applied to the sample, because matrix constituents are also pre-concentrated, so that a higher sample concentration may not lead necessarily to a better sensitivity due to higher matrix effects [24]. Thus, in this work we introduce the concept of effective concentration factor (ECF), which considers the theoretical concentration factor (TCF) and matrix effects. Thus, evaluation of ECF permits to know whether an increase of the TCF will lead to an improved sensitivity or not, because of the increased magnitude of matrix effects.

Hence, the TCF would be the maximum preconcentration factor achievable, considering quantitative recoveries, and it is defined as:

$$TCF = \frac{\text{Sample volume}}{\text{Final extract volume}} \quad (2)$$

In this way, the ECF, taking matrix effects into account is defined as:

$$ECF = \frac{\%ME \times TCF}{100} \quad (3)$$

2.7. Method performance evaluation and quality assurance

LODs and LOQs were determined on the basis of the peak-to-peak signal-to-noise (S/N) ratio, being the LOD defined for a S/N = 3 and the LOQ for a S/N = 10, as the commonest criteria used with chromatography–MS(/MS) determinations. In the case of the LC–MS/MS method (without enrichments) it was evaluated with pure standards in concentrations as close as possible to the LOQ. In the case of the whole method (SPE + LC–MS/MS) it was determined by measuring the S/N ratio from 20 ng L⁻¹ spiked (influent or effluent) wastewater samples.

Linearity of the LC–MS/MS method was estimated by constructing a calibration plot with the following concentrations: 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng mL⁻¹ (ISs: 100 ng mL⁻¹). Each calibration level was injected three times and those levels that were below LOQ for a determinate analyte were not considered, so that there were at least seven calibration levels for each analyte. No concentration weighting was applied.

The precision of the LC–MS/MS was evaluated with pure standards at two different concentration levels ($n=6$), as relative standard deviation (RSD). The trueness and precision of the whole method (including SPE) was evaluated with ultrapure (Milli-Q) water and influent and effluent wastewater spiked with 20 or 200 ng L⁻¹ of the analytes (ISs: 100 ng L⁻¹), $n=4$. Trueness was evaluated as the recovery from methanolic standard calibrations by the internal standard method (see IS used with each analyte in Table 2) and considering the original concentration of analytes in non-spiked samples. Precision was expressed as RSD from the same experiments.

Blanks ($n=3$) were also measured together with samples, but none of the analytes was detected in such experiments. Since the sample matrix complexity varies from sample to sample, their S/N was measured before reporting an analyte above LODs or LOQs.

3. Results and discussion

3.1. LC–MS/MS

3.1.1. Selection of eluent modifier

Selection of an adequate eluent modifier in LC–MS is essential in order to improve the ESI efficiency (and consequently sensitivity) and chromatographic separation. Typical modifiers used for the determination of BZPs (together with illicit drugs, pharmaceutical and other pollutants) are acetic acid [11,18,20], formic acid [21,24,25] and ammonium acetate or formate [13,15,19].

In this work, acetic acid, formic acid and ammonium acetate, were considered by flow-injection experiments (without column) at 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. The mobile phase consisted in MeOH/H₂O (50:50, v/v) with the corresponding amount of modifier in each experiment: 0–0.5% of acid or 0–50 mM of ammonium acetate. A solution of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ containing each analyte was injected ($n=3$) and the MRM response (peak area) for the analytes in each set (acetic acid, formic acid or ammonium acetate,) were normalized respecting the area obtained when no modifier is used, so that a value lower than 1 means that modifier lead to signal suppression, while values higher than 1 imply an enhancement on the signal.

A summary of the results obtained is presented in the Supplementary Material (Fig. S1, as Box- and-Whisker plots). Acetic acid provides an average 1.5–2 fold enhancement respect to unbuffered eluent. In some cases the enhancement, depending on the analyte was close to 350%, while even in the worst cases the signal was not lower than without acetic acid. Moreover, the concentration of acetic acid had little effect on the average signal (Fig. S1). With formic acid, the MRM average signal increased up to a 0.05% concentration and then started decreasing, leading to signal suppression at concentrations around 0.5% (Fig. S1).

Finally, the introduction of ammonium acetate leads to a ca. 1.5-fold enhancement in the mean response at 1 mM concentration, and then signal suppression starts to take place when the concentration of buffer is increased. The same effect has been reported for other compounds such as bactericides (parabens, triclosan and triclocarban) [29] and UV filters [30].

In view of the above results, acetic acid was selected as eluent modifier. Since, no clear change in the average response is observed within the concentration range tested, this was fixed at 0.1%, in order to grant enough buffering capacity for a rugged chromatography with real samples. Different gradients were tested, until a satisfactory separation was obtained. A chromatogram of a 10 ng mL⁻¹ standard is presented in Fig. 1.

3.1.2. LC–MS/MS method performance

The instrumental method was tested in terms of LOQs, linearity and precision at two concentration levels, with a concentration of ISs of 100 ng mL⁻¹. These data are summarized in Table 3.

Instrumental LOQs (ILQs) ranged between 0.05 and 8.3 ng mL⁻¹ (0.5–83 pg injected). Better LOQs (ca. 2–10 fold lower) were obtained by Baker et al. using an ultra(high)performance liquid chromatography (UPLC) system coupled to a triple quadrupole for TEM, DIA, NDIA, OXA and CHLOR [11]. Compared to a LC-high resolution-MS (Orbitrap), similar LOQs were obtained for OXA and NDIA but in the case of MPHEN, TEM and DIA, the high resolution instrument provided ca. 2–3.5 fold higher LOQs [24].

BZPs showed an excellent linear range with methanolic standards (ILQ–1000 ng mL⁻¹) with coefficient of determination (R^2) higher than 0.9990 for all analytes, including those where their own deuterated IS was not available. Also, the intercept was checked not to be statistically different to 0 by Student t -test (95% confidence level). Precision, in terms of RSD was lower than 15% at the 10 ng mL⁻¹ concentration level and lower than 10% at 100 ng mL⁻¹.

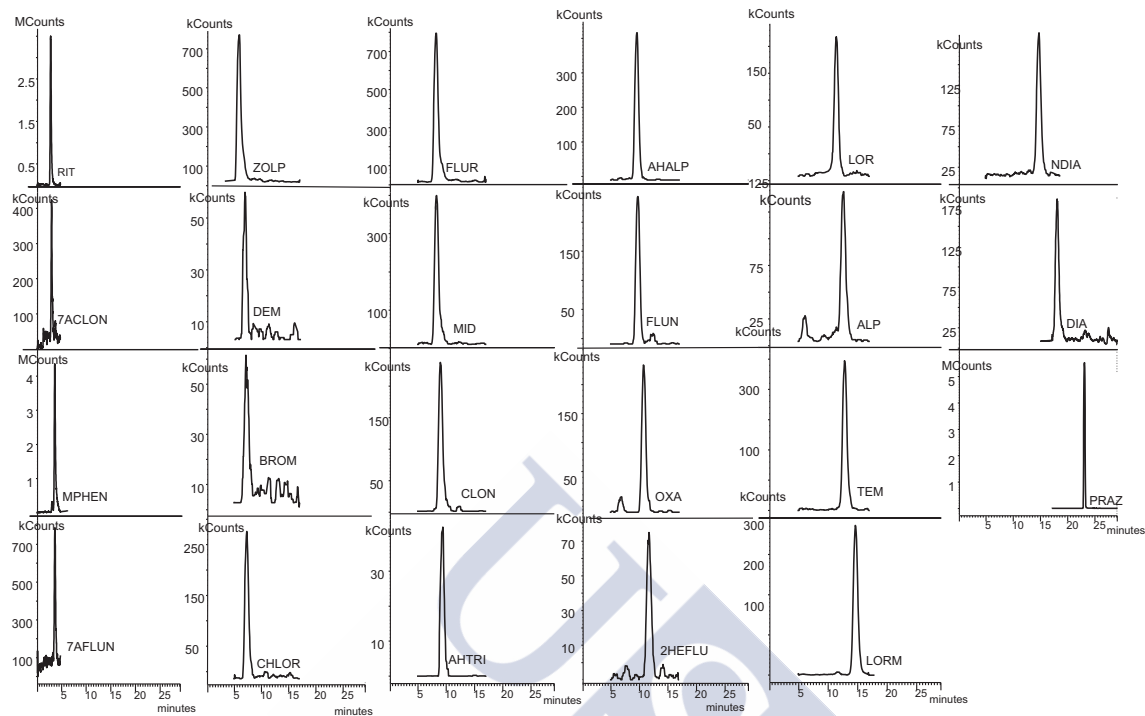


Fig. 1. MRM traces of the LC-MS/MS analysis of a 10 ng mL⁻¹ standard.

These data are similar to those reported in the literature for some BZPs [11,24]. Regarding method throughput, it is also similar to other published methods but could be improved by using UPLC instead of conventional LC, as shown by Huerta-Fontela et al. [13].

3.2. Stability of analytes in water

Studies about the stability of BZPs in water are mandatory in order to avoid bias due to possible losses and transformations in the sample before analysis and to find out the best way to store

Table 3
LC-MS/MS performance figures.

Comp.	LOQ ^a (ng mL ⁻¹)	Linearity ^b			% RSD (n = 6)	
		Intercept	Slope	R ²	10 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹
RIT	0.3	-0.044	0.045	0.9991	6.5	5.1
7ACLON	4.1	0.045	0.011	0.9995	10.5	1.9
MPHEN	0.4	-0.072	0.024	0.9998	2.6	1.2
7AFLUN	3.8	-0.0047	0.067	0.9998	7.8	2.0
ZOLP	0.5	-0.048	0.018	0.9995	7.2	2.7
DEM	2.0	-0.013	0.0041	0.9995	4.6	4.8
BROM	3.3	-0.022	0.0082	0.9992	12.8	4.1
CHLOR	2.2	-0.064	0.032	0.9993	8.1	2.2
FLUR	1.8	-0.15	0.081	0.9999	4.7	3.1
MID	3.3	-0.062	0.027	0.9991	9.3	4.4
CLON	2.5	-0.071	0.017	0.9994	10.8	6.4
AHTRI	5	-0.012	0.0031	0.9990	12.9	8.6
AHALP	8.3	-0.022	0.023	0.9995	12.8	9.4
FLUN	5.0	-0.054	0.024	0.9990	9.2	7.2
OXA	2.5	-0.085	0.024	0.9997	5.6	4.8
2HEFLU	5.0	-0.018	0.0074	0.9998	11.1	2.2
LOR	1.5	0.076	0.031	0.9993	14.8	5.9
ALP	0.3	-0.036	0.015	0.9995	4.1	5.5
TEM	1.0	-0.42	0.15	0.9992	8.4	2.2
LORM	0.2	-0.012	0.0054	0.9993	3.8	2.5
NDIA	2.5	-0.042	0.022	0.9992	1.8	2.3
DIA	1.2	-0.043	0.021	0.9993	6.1	2.5
PRAZ	0.05	-0.0093	0.017	0.9990	1.7	1.7

^a Calculated as S/N = 10 from a methanolic standard.

^b LOQ-1000 ng mL⁻¹ calibration curve (n = 3 replicates per level). ISs in a concentration of 100 ng mL⁻¹. See Section 2.7 for details.

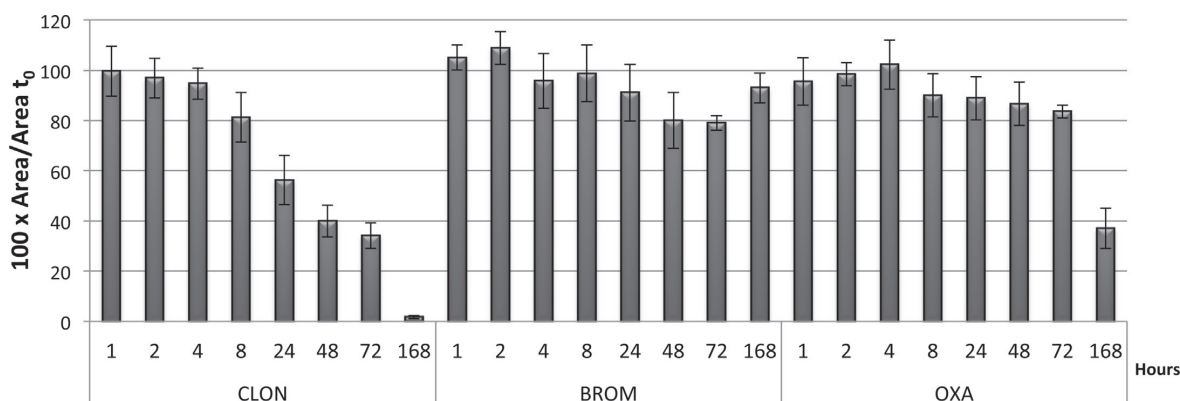


Fig. 2. Relative response of three BZPs as a function of storage time at wastewater natural water pH 7.4 and room temperature ($18 \pm 1^\circ\text{C}$). Results normalized to the area of analytes at time = 0, expressed as a percentage.

samples if they cannot be analyzed immediately after sampling. Sample acidification and temperature decrease (-20°C or 4°C) have been demonstrated as effective means to improve the stability [31,32], and were therefore, investigated. Thus, four sets were prepared to evaluate the effect of temperature, 4°C and room temperature (20°C) and acidification (pH 2) or natural pH (ca. pH 7.4). All four sets were prepared with 20 mL of unfiltered influent wastewater samples ($n=3$) spiked with $200\ \mu\text{L}$ of a $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ mixed solution ($100\ \text{ng mL}^{-1}$ of each analyte in the final solution), kept in amber glass vials and stored in the dark. Aliquots of these solutions were taken at different time intervals up to a week. In order to remove bacteria and to stop possible biodegradation, each aliquot ($1.5\ \text{mL}$) was filtered through a $0.22\ \mu\text{m}$ nitrocellulose filter, spiked with deuterated ISs and kept at -20°C until direct analysis by LC-MS/MS. Fig. 2 exemplary shows the results at room temperature at the sample natural pH for three representative BZPs.

All compounds were stable for up to 72 h at room temperature in wastewater (at natural pH) except CLON and FLUN, where a 50% decrease was observed already during the first 24 h and became undetectable after a week. At 7 days, degradation was also evident for NDIA and DIA (>80% decrease) and 2HEFLU, CHLOR, LOR, LORM, MID, OXA, TEM and ZOLP (ca. 50% decrease). Refrigeration improved the stability of some compounds. However, particularly for CLON and FLUN still a 50% decrease was detected in 24 h. Our data are in agreement with the observation of Baker et al. [31], for the BZPs considered in their work.

Acidification of samples to pH 2 improved the stability for all the compounds, especially for CLON (50% degradation in one week) and FLUN, DIA and NDIA (no apparent decrease was observed over a week). Unfortunately, the two BZP metabolites with 7-amino functionalities (7ACLON and 7AFLUN) completely disappeared immediately when the sample was adjusted to pH = 2. However, the products of such a reaction could not be detected by LC-MS scan measurements, neither in the positive nor the negative ionization mode (data not given).

In view of the above results, samples were not acidified and they were extracted as soon as possible, in order to avoid underestimation of CLON and FLUN. Once extracted, SPE cartridges could be dried and stored for a longer time as demonstrated for illicit drugs and other pharmaceuticals [31,33]. If it is not possible to extract them when received, then addition of deuterated ISs and refrigeration could be used to compensate losses of CLON and FLUN, at the expenses of the possibility of not detecting them if storage time is too long.

3.3. Filtration

Filtration is necessary in order to avoid SPE cartridges clogging, but some compounds may be retained into the organic membrane of the filter, leading to biased results. Thus, possible losses during this step were investigated with influent samples, which were spiked with the analytes ($100\ \text{ng L}^{-1}$) either after or before filtration. The results of these experiments showed no significant difference (Supplementary Material, Fig. S2), proving that no undesirable adsorptions are produced during filtration, in agreement with Baker et al. [31], who evaluated different filter membrane materials and pore sizes for different pharmaceuticals, including some BZPs.

3.4. Optimization of SPE

3.4.1. Extraction pH

Bearing in mind the acid–base properties of the analytes (see Table 1) aliquots of ultrapure water ($200\ \text{mL}$, $n=3$) at different pHs were tested (i.e. pH = 4.5, 7, 9.5 and 12), adjusted with diluted HCl or NaOH, with three types of cartridges (Oasis HLB, MCX and MAX). The experimental procedure with each sorbent is detailed in Section 2.4.

The results of these experiments are presented in Fig. 3, for six analytes, representative of the different behaviors observed: 2HEFLU represents the other hydroxylated analytes (AHTRI and AHALP), 7ACLON the amino-substituted metabolites (7AFLUN), RIT the only carboxylated analyte, FLUN the other nitro-substituted compound (CLON), BROM the only brominated analyte, and finally MID the remaining analytes.

Thus, with the pure hydrophilic reversed-phase sorbent, Oasis HLB, there were not significant differences on recovery of analytes at different pHs, excepting RIT. With this analyte, recoveries are only slightly higher at pH 4.5 due to its acidic character ($\text{pK}_a = 3.5$), but relatively low anyway. An improved recovery of RIT with the Oasis HLB sorbent would only be possible at lower pH values, which could not be employed because of the lack of stability of 7ACLON and 7AFLUN (see Section 3.2). Hence, no pH adjustment would be required with the Oasis HLB material, since the sample natural pH is at ca. 7–8, at the expenses of RIT recovery.

Oasis MCX cartridges permit a better retention of basic compounds and the fractionation of basic analytes from neutral and acidic species during cartridge elution. Thus, a fractionated elution was considered with a first methanolic fraction (F1), where only the analytes retained by reversed-phase mechanism were eluted

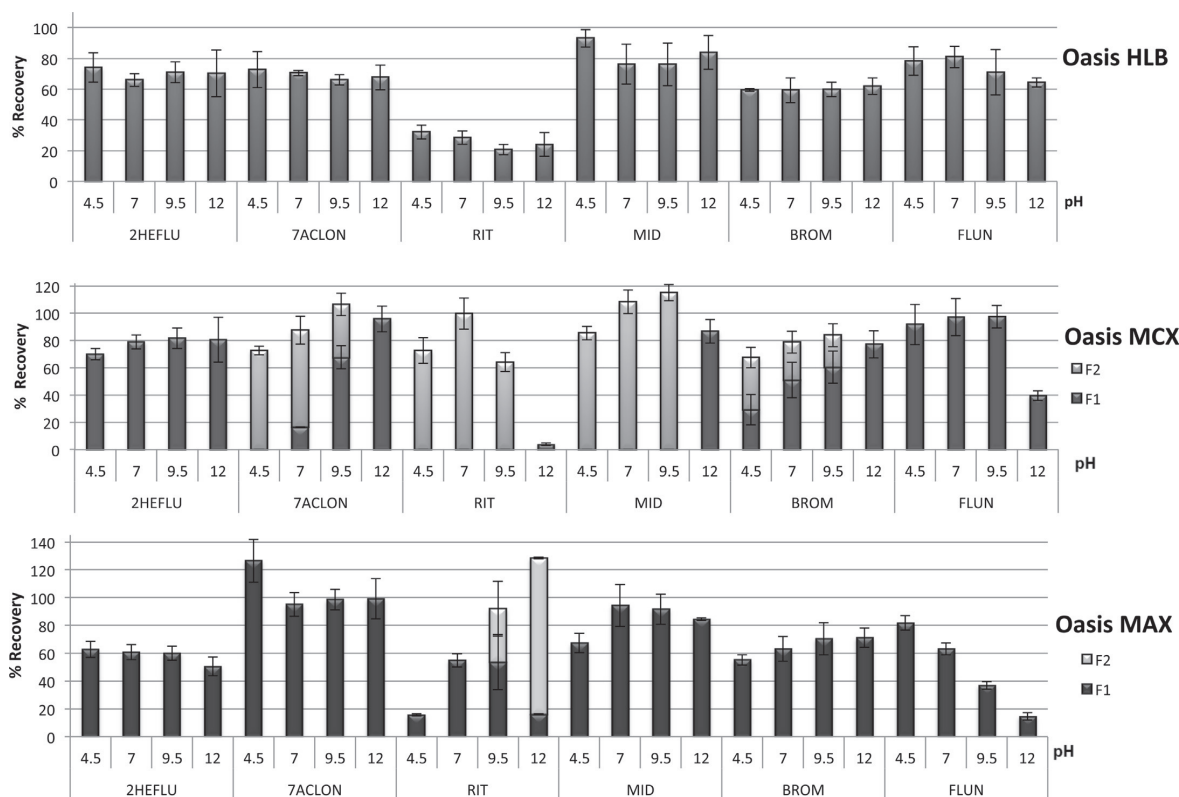


Fig. 3. SPE recoveries of selected BZPs as a function of sample pH. N.B.: two elution fractions were collected with Oasis MCX and Oasis MAX (see text for details).

(neutral and acidic compounds), and then a second elution with MeOH/NH₃ (F2) where the basic analytes retained by cationic-exchange could be eluted [34,35]. As shown in Fig. 3, recoveries are good for most analytes. Some compounds were mostly retained by reversed-phase interaction within the whole pH range investigated (4.5–12) as they are always eluted in the methanolic fraction (2HEFLU, AHTRI, AHALP, CLON, DEM, FLUN, LOR, LORM, OXA, PRAZ and TEM), despite the fact that they should be partially ionized at pH values lower than 10 ($pK_a = 10.3–14.4$). Other compounds (7ACLON, 7AFLUN, ALP, BROM, DIA, MPHEN, MID, NDIA, ZOLP, CHLOR and FLUR) were, however, retained by both mechanisms, prevailing one or the other as a function of the sample pH (see e.g. 7ACLON and MID in Fig. 3). Finally, again RIT exhibited a unique behavior due to its amphoteric character. Thus, this compound was retained mostly by cationic-exchange because it bears always a negative and positive charge in the pH range investigated up to pH 12. At pH = 12 the amine group is deprotonated, leaving RIT with a neat negative charge, thus rendering a negligible retention (Fig. 3). Hence, as with Oasis HLB, no pH adjustment of samples is necessary with Oasis MCX.

Oasis MAX are also mixed-mode materials, but with anionic-exchange character. Thus, in this case F1 (MeOH) will elute neutral and basic analytes and F2 (MeOH/formic acid) acidic compounds. As shown in Fig. 3, retention was in general worse (lower recoveries) than with the other two cartridges and the great majority of compounds are retained by reversed-phase interactions only (eluted in F1). In most cases recoveries were independent of the pH, but for FLUR, MID, MPHEN and ZOLP, whose recoveries increased with the pH, in agreement with their basic character. On the other hand

FLUN, LORM and TEM improved their recoveries when the pH was lower due to their acidic character. The only analytes retained (partially) by anionic-exchange were RIT, CLON and DEM at high pHs. Yet, again neutral pH provided the best compromise recoveries.

3.4.2. Breakthrough volume

The breakthrough volume was evaluated with filtered samples at their natural pH and spiked with 100 ng L⁻¹ of the analytes. Tests ($n = 3$) were carried out with 200 mL ultrapure water, 200 mL effluent and 100 mL of influent wastewater percolated through two cartridges connected in series. Independently of the sample matrix and sorbent, breakthrough was detected for RIT, because of its acidic character and impossibility of bringing sample pH to acidic conditions, as previously discussed. Moreover, a 10–20% breakthrough was also observed for FLUN and MPHEN (the precursor drug of RIT) with the Oasis MAX material. An example of the breakthrough profile is provided in the Supplementary Material (Fig. S3).

The Oasis MCX cartridges were finally selected on the basis of a slightly higher recovery of RIT. An increase of the sorbent amount (from 60 to 150 mg) did not solve the breakthrough of RIT completely, so 60 mg cartridges were employed because of their lower price and the availability of RIT-d₅ for recovery correction. Elution was completely achieved with only 5 mL of MeOH (1.25% NH₃) and no losses of analytes were detected during the evaporation process.

3.4.3. Final extract volume and matrix effects

Matrix effects are a serious issue that needs to be considered into LC–MS/MS analysis as it may provide biased results unless properly corrected (e.g. by the use of isotopically labeled ISs) and to increased

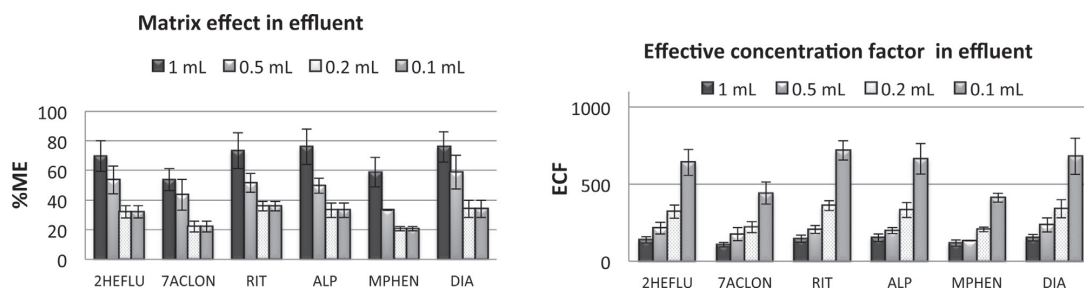


Fig. 4. %ME (left) and ECF (right) as a function of the final extract volume obtained with spiked effluent wastewater. See definition of %ME and ECF in Section 2.6.

Table 4

Limits of quantification, trueness and precision for the SPE-LC-MS/MS method.

Comp.	Ultrapure water samples		Influent samples		Effluent samples	
	Recoveries ^a (RSD), n = 4 (20 ng L ⁻¹)	Recoveries ^a (RSD), n = 4 (200 ng L ⁻¹)	LOQ ^b (ng L ⁻¹)	Recoveries ^a (RSD), n = 4 (200 ng L ⁻¹)	LOQ ^b (ng L ⁻¹)	Recoveries ^a (RSD), n = 4 (200 ng L ⁻¹)
RIT	116 (6)	114 (1)	0.4	95 (14)	0.4	102 (8)
7ACLON	111 (11)	96 (12)	9.0	105 (6)	9.4	113 (5)
MPHEN	114 (10)	106 (7)	1.1	106 (15)	0.9	110 (3)
7AFLUN	86 (13)	100 (9)	9.1	86 (10)	9.3	106 (9)
ZOLP	116 (8)	96 (9)	1.0	100 (5)	0.9	110 (3)
DEM	95 (13)	108 (4)	4.3	86 (15)	2.6	88 (10)
BROM	93 (21)	111 (16)	5.5	102 (16)	5.8	99 (12)
CHLOR	111 (10)	96 (14)	4.2	94 (8)	3.1	98 (7)
FLUR	100 (12)	88 (6)	3.3	96 (7)	3.2	106 (6)
MID	98 (15)	88 (13)	5.9	109 (9)	5.5	102 (5)
CLOX	102 (19)	99 (16)	4.7	89 (4)	4.0	108 (7)
AHTRI	94 (14)	101 (1)	10.5	100 (10)	8.9	96 (10)
AHALP	111 (7)	110 (6)	17.5	95 (14)	13.2	122 (7)
FLUN	105 (11)	100 (4)	10.8	102 (14)	8.1	91 (4)
OXA	122 (6)	102 (11)	3.9	97 (11)	3.3	96 (17)
2HEFLU	112 (6)	111 (5)	9.8	103 (10)	7.8	102 (4)
LOR	109 (9)	107 (8)	2.2	86 (18)	2.2	111 (13)
ALP	115 (10)	100 (6)	0.5	91 (19)	0.5	107 (8)
TEM	97 (5)	120 (3)	1.6	100 (7)	1.4	89 (13)
LORM	108 (10)	99 (8)	0.4	120 (5)	0.3	90 (7)
NDIA	112 (11)	100 (9)	3.9	100 (13)	3.0	105 (2)
DIA	117 (4)	93 (7)	2.2	84 (17)	1.0	108 (3)
PRAZ	88 (11)	87 (13)	0.1	95 (5)	0.1	115 (8)

^a ISs in a concentration of 100 ng L⁻¹.

^b calculated as S/N = 10 from a 20 ng L⁻¹ spiked wastewater.

Table 5

Comparison of analytical methods for the determination of BZPs and related compounds in environmental water samples. N.B.: only those methods considering 5 or more BZPs are included in this Table.

Total no. of analytes considered	No. of BZPs and related analytes	SPE	Determination technique ^a	Recoveries (%)	RSD (%)	LOQ (ng L ⁻¹)	Ref.
65	7	Oasis MCX	UPLC-MS/MS (QQQ)	48–205	2–41	0.1–21	[11]
55	7	Oasis HLB	UPLC-MS/MS (QLIT)	71–110	1–5	0.02–15	[13]
24	6	Oasis HLB	LC-MS (Orbitrap)	45–105	4–27	2–27	[24]
31	5	Oasis HLB (on-line)	LC-MS/MS (QQQ)	– ^b	2–14 ^b	1–10 ^b	[36]
23	23	Oasis HLB	LC-MS/MS (QQQ)	84–122	3–21	0.1–18	This work

^a Abbreviations: UPLC: ultra(high)performance liquid chromatography, QQQ: triple quadrupole, QLIT: quadrupole-linear ion trap hybrid system.

^b Recovery data not given, rest of parameters derived from surface water samples.

Table 6

Concentration (ng L⁻¹) of the target analytes in wastewater and river water samples. Mean of 3 replicates (RSD < 22% in all samples). Those analytes below LOD in all samples are not included in this table.

	Sample ID	RIT	MPHEN	ZOLP	OXA	LOR	ALP	TEM	LORM	NDIA	DIA
Influent	#1	37	<LOD	<LOD	22	13	3.3	5.8	28	5.0	<LOQ
	#2	170	<LOD	3.9	74	61	5.3	24	108	18	7.9
	#3	154	<LOD	2.9	82	36	8.8	14	10	13	5.4
Effluent	#4	99	7.1	1.9	52	40	8.0	15	25	9.9	3.2
	#5	73	<LOD	1.5	70	36	7.0	12	7.7	9.6	2.2
River	#6	0.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
	#7	2.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
	#8	5.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
	#9	3.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD

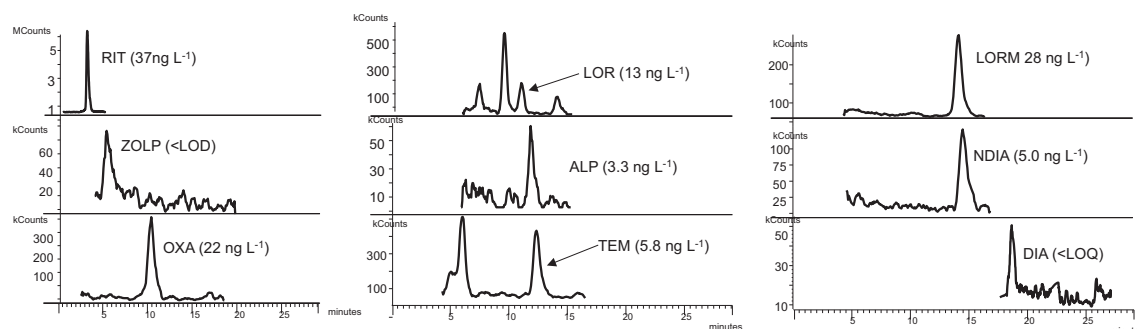


Fig. 5. Chromatogram of influent wastewater no. 1.

LOQs due to signal suppression. Thus, the final volume where the extract is reconstituted affects matrix effects (as matrix is equally concentrated), so that the ECF (see Section 2.6) may be lower than expected.

Thus, both parameters (%ME and ECF) were evaluated together with influent and effluent wastewater samples and different final extract volumes. This was performed by spiking samples after the SPE process in order to obtain a concentration of 100 ng mL^{-1} in the final reconstituted extract.

Fig. 4 exemplary shows the %ME obtained for some of the analytes in the effluent wastewater. As it can be observed %ME are typically at ca. the 70% range when the final extract volume is 1 mL (i.e. when $\text{TCF}=200$). When the extract volume is decreased to 0.5 mL, %ME drop significantly, so that even when the TCF is the double, the ECF factor is only slightly increased (Fig. 4). However, if the final volume is further lowered to 0.2 and 0.1 mL, %ME also decrease, but not so significantly, so that there is a clear improvement on ECF (Fig. 4). Thus, with 0.1 mL as final extract volume %ME are around 30% and ECF at ca. 700 (instead of the TCF of 2000). Similar results were obtained with influent (see Supplementary Material, Fig. S4), although %ME were not so severe because a lower volume of sample was extracted (100 mL instead of 200, see Section 3.4.2). Therefore, the final extract volume was fixed at 0.1 mL.

3.5. Performance of the SPE followed by LC–MS/MS analytical method

The performance figures of the analytical method are compiled in Table 4, whereas Table 5 presents a comparison to already published methods, considering only those which cover at least 5 BZPs and related compounds.

The LOQ was defined as the concentration producing a signal-to-noise ratio (S/N) equal to 10. It was estimated from wastewater spiked with 20 ng L^{-1} of the analytes and considering also the original concentration in the non-spiked sample. In the same way, the LOD can be calculated as three times the S/N (LOD was not given but it can be easily calculate by multiplying LOQ by 0.333). As shown in Table 4, LOQs ranged from 0.1 to 18 ng L^{-1} . These LOQ are better than those obtained with LC-high resolution-MS [24] and similar to those obtained by UPLC-MS/MS after off-line [11,13] or on-line SPE [36], for the BZPs considered in that study (see Table 5).

The trueness of the method was determined in terms of recovery (corrected by the use of the isotopically labeled surrogates), with Milli-Q water (200 mL) spiked at two concentration levels (20 and 200 ng L^{-1}), and both effluent (200 mL) and influent (100 mL) wastewater samples spiked with 200 ng L^{-1} of the analytes. Unspiked samples were also measured and their concentration considered in recovery calculations. Recoveries ranged between 84 and 122% (Table 4) independently of the sample matrix, which can

be considered as satisfactory, compared to other published methods (Table 5).

The precision, in terms of RSD, was obtained from the same recovery experiments. The obtained RSDs ranged between 4 and 21% in the lowest concentration level (ultrapure water) and oscillated between 2 and 19% with wastewater samples (Table 4). Again, RSDs are satisfactory, particularly considering that deuterated ISS are not available for all the analytes, and similar to those reported in the literature (Table 5), except in the case of the study of Huerta-Fontela et al. who reported RSD values lower than 6% for the 7 BZPs they considered [13].

3.6. Application to real samples

Samples of influent and effluent wastewater and rivers were collected in different days and analyzed by triplicate. As presented in Table 6, RIT, ALP, DIA, LOR, LORM, NDIA, OXA, TEM and ZOLP were present in the $2\text{--}170 \text{ ng L}^{-1}$ range in wastewater. As an example, a chromatogram of the compounds detected in sample no. 1 is shown in Fig. 5. Due to the dilution of the analytes in the bulk surface water streams, most compounds were below the LOQ in the samples from river water but RIT, which was detected at low concentrations ($0.5\text{--}5.4 \text{ ng L}^{-1}$), in concordance with the rest of publications where surface or ground water is analyzed [11,15,20,37]. It is noteworthy that RIT is among the analytes detected at highest concentrations, although seldom measured in the literature.

In general, TEM and OXA were the BZPs detected in highest concentration in Europe [11,12,38]. However, the concentrations detected in this work were lower than those reports. The same trend was obtained when comparing the data to a study on north-eastern (NE) Spain for OXA, LOR and CHLOR [13]. Yet, for other BZPs usually measured, as DIA, ALP, NDIA, LOR and LORM, the concentrations were very similar to those reported in several countries of Europe [12,20,38], including Spain [15,25,37]. The only study performed in our area (NW Spain) performed by Esteban et al. [14] in 2008–2009 reported the presence of ALP, NDIA and OXA at same level than in this work, except for LOR, where they found an extremely high concentration with an average of ca $10 \mu\text{g L}^{-1}$ in influent and 700 ng L^{-1} in effluent that they assigned to a use of this pharmaceutical in stockbreeding in the area they controlled.

Regarding non-BZPs, the presence of MPHEN has only been reported by Bijlsma et al. [12] at very low concentrations, but its metabolite (RIT) was not considered. On the other hand, Burgard et al. [39] reported concentrations of RIT ten-times higher than in this work (up to 1500 ng L^{-1}) in raw wastewater in the fall semester in USA. ZOLP was analyzed in the NE of Spain and it was always detected near to the LOQ [13,37], as in our work. Anyway, a further

detailed study is necessary because also, as mentioned, most published works considered a limited set of BZPs.

4. Conclusions

A new method to evaluate the presence of BZPs, metabolites and related drugs in water and has been optimized. It permits the simultaneous determination of 23 of this type of analytes as compared to previous literature methods not permitting the determination of more than 7 BZPs and related analytes. The method is based on SPE with Oasis MCX mixed-mode materials and the final preconcentration factor was selected of a newly introduced parameter, the ECF that takes into account also matrix effects. Since part of the analytes are degraded very fast even when refrigerated, IS addition and extraction is recommended as soon as possible. No acidification can be performed as some of the analytes are degraded as such pH, but SPE cartridges can be used for sample storage. The method affords LOQs in the $0.1\text{--}18\text{ ng L}^{-1}$ range with satisfactory recoveries (84–122%) and RSDs (<22%). The application of the method showed the presence of 10 of the target analytes in wastewater, up to 170 ng L^{-1} (RIT).

Acknowledgements

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (*Ministerio de Economía y Competitividad*) Regional government (*Xunta de Galicia*) and FEDER funds through: Project nos. CTQ2010-18927, CTQ2012-33080 and EM 2012/055; FPI grants (awarded to Inés Racamonde and Eugenia Villaverde-Sáa) and *Ramón y Cajal* research program (awarded to Rosario Rodil). We are also grateful to VIAQUA for providing access to wastewater samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.064>.

References

- [1] J.H. Woods, J.L. Katz, G. Winger, in *Psychopharmacology*, American College of Neuropsychopharmacology. Abuse and Therapeutic Use of Benzodiazepines and Benzodiazepine-Like Drugs (New York) 1995. Available from: www.acnp.org/g4/GN401000172/CH168.html
- [2] S. Anthierens, H. Habraken, M. Petrovic, T. Christiaens, *Scand. J. Prim. Health* 25 (2007) 214.
- [3] R.C.O. Voshaar, J.E. Couvée, A.J.L.M. Van Balkom, P.G.H. Mulder, F.G. Zitman, *Br. J. Psychiatr.* 189 (2006) 213.
- [4] J. Simó Miñana, *Aten. Primaria* 44 (2012) 335.
- [5] Use of anxiolytic and sedative pharmaceuticals in Spain during the period 2000–2012 (in Spanish), Spanish Ministry of Health, Social Services and Equal Rights, 2013. Available from: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/ansioliticos.hipnoticos-2000-2012.pdf>
- [6] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Sexual assaults facilitated by drugs or alcohol, Lisbon, 2008. Available from: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/technical-datasheets/dfsa>
- [7] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Drug profiles: scientific descriptions of drugs (Benzodiazepines). Available from: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/benzodiazepine>
- [8] A Use of Benzodiazepines in Spain 1992–2006 (in Spanish). Spanish Agency of Pharmaceuticals and Health Products. Available from: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/ansioliticos.hipnoticos.pdf>
- [9] D. Volkow Nora, M. Swanson James, *Am. J. Psychiatr.* 160 (2003) 1909.
- [10] C.J. Teter, S.E. McCabe, C.J. Boyd, S.K. Guthrie, *Pharmacotherapy* 23 (2003) 609.
- [11] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1620.
- [12] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, *Chemosphere* 89 (2012) 1399.
- [13] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4212.
- [14] S. Esteban, Y. Valcárcel, M. Catalá, M. Castromil González, *Gac. Sanit.* 26 (2012) 457.
- [15] Y. Valcárcel, F. Martínez, S. González-Alonso, Y. Segura, M. Catalá, R. Molina, J.C. Montero-Rubio, N. Mastroianni, M. López de Alda, C. Postigo, D. Barceló, *Environ. Int.* 41 (2012) 35.
- [16] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Chem.* 81 (2009) 898.
- [17] A. Mendoza, M. López de Alda, S. González-Alonso, N. Mastroianni, D. Barceló, Y. Valcárcel, *Chemosphere* 95 (2013) 247.
- [18] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7901.
- [19] A. Jurado, N. Mastroianni, E. Vázquez-Suñé, J. Carrera, I. Tubau, E. Pujades, C. Postigo, M. López de Alda, D. Barceló, *Sci. Total Environ.* 424 (2012) 280.
- [20] S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4989.
- [21] C. Repice, M.D. Grande, R. Maggi, R. Pedrazzani, *Sci. Total Environ.* 463–464 (2013) 27.
- [22] O.H. Drummer, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 201.
- [23] T. Kosjek, S. Perko, M. Zupanc, M. Zanoski Hren, T. Landeka Dragicevic, D. Zigon, B. Kompare, E. Heath, *Water Res.* 46 (2012) 355.
- [24] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, *Anal. Chim. Acta* 768 (2013) 102.
- [25] M.J. Martínez Bueno, A. Agüera, M.J. Gómez, M.D. Hernando, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9372.
- [26] A. Kloepper, J.B. Quintana, T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 153.
- [27] R. Rodil, J.B. Quintana, T. Reemtsma, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3083.
- [28] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019.
- [29] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1756.
- [30] R. Rodil, J.B. Quintana, P. Lopez-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1307.
- [31] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8036.
- [32] S. Castiglioni, E. Zucato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8421.
- [33] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1748.
- [34] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, M. González-Díez, R. Cela, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1708.
- [35] I. Senta, I. Krizman, M. Ahel, S. Terzic, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3255.
- [36] M. Östman, J. Fick, E. Näsström, R.H. Lindberg, *Sci. Total Environ.* 472 (2014) 862.
- [37] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, *Water Res.* 45 (2011) 1432.
- [38] A. Wick, G. Fink, A. Joss, H. Siegrist, T.A. Ternes, *Water Res.* 43 (2009) 1060.
- [39] D.A. Burgard, R. Fuller, B. Becker, R. Ferrell, M.J. Dinglasan-Panlilio, *Sci. Total Environ.* 450–451 (2013) 242.

SUPPLEMENTARY MATERIAL TO:

***DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES, RELATED PHARMACEUTICALS
AND METABOLITES IN WATER BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND
LIQUID-CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY***

Inés Racamonde, Rosario Rodil, José Benito Quintana*, Eugenia Villaverde-de-Sáa,
Rafael Cela.

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, IIAA-Institute
for Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela R/ Constantino
Candeira SN 15782 Santiago de Compostela, Spain.

* Corresponding author: Phone: +34881814263 and +34881816035; E-mail:
jb.quintana@usc.es

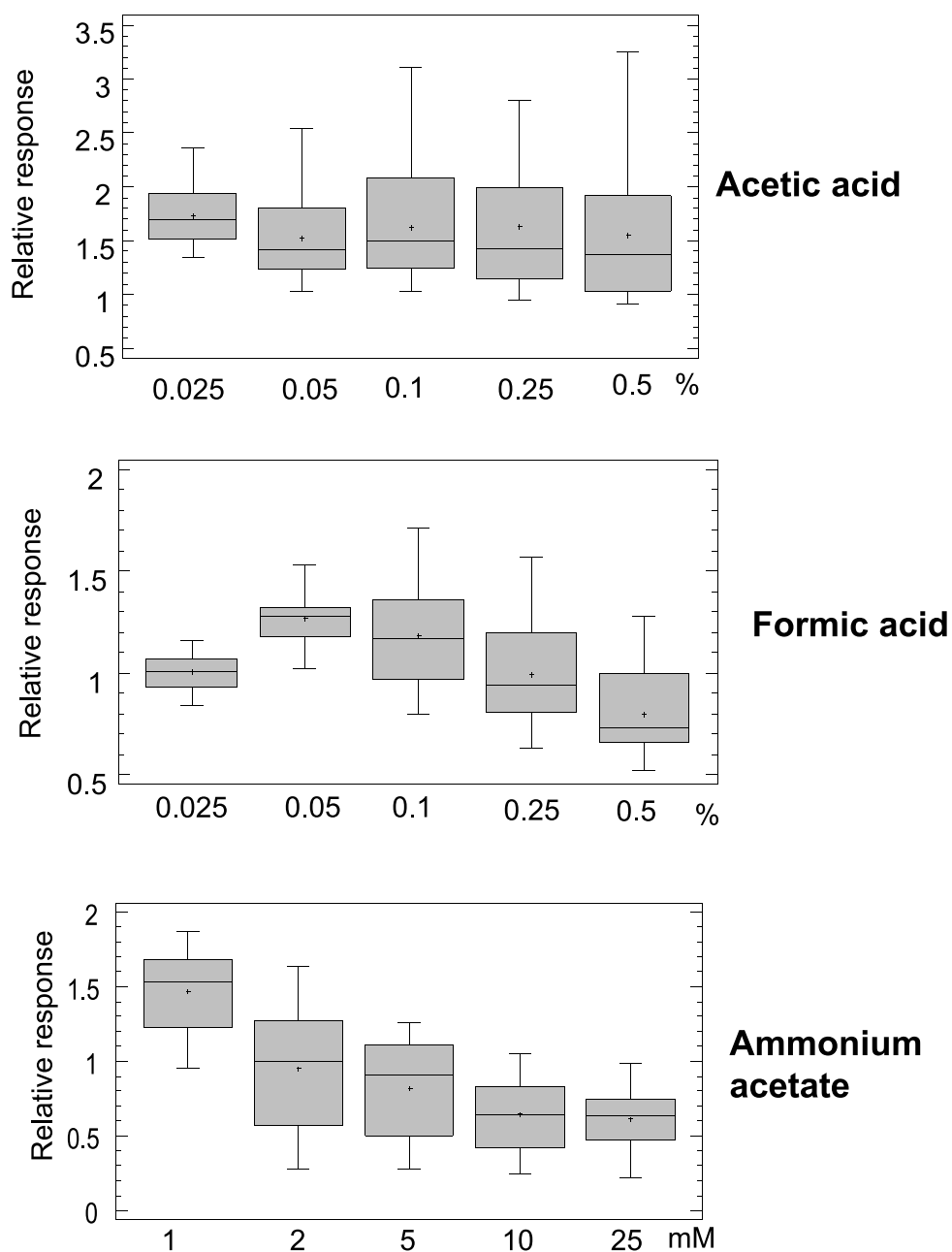


Figure S1. Box-and-Whisker plots summarizing the effect of effluent modifier on ESI-MS/MS response. Responses normalized to pure eluent without modifier.

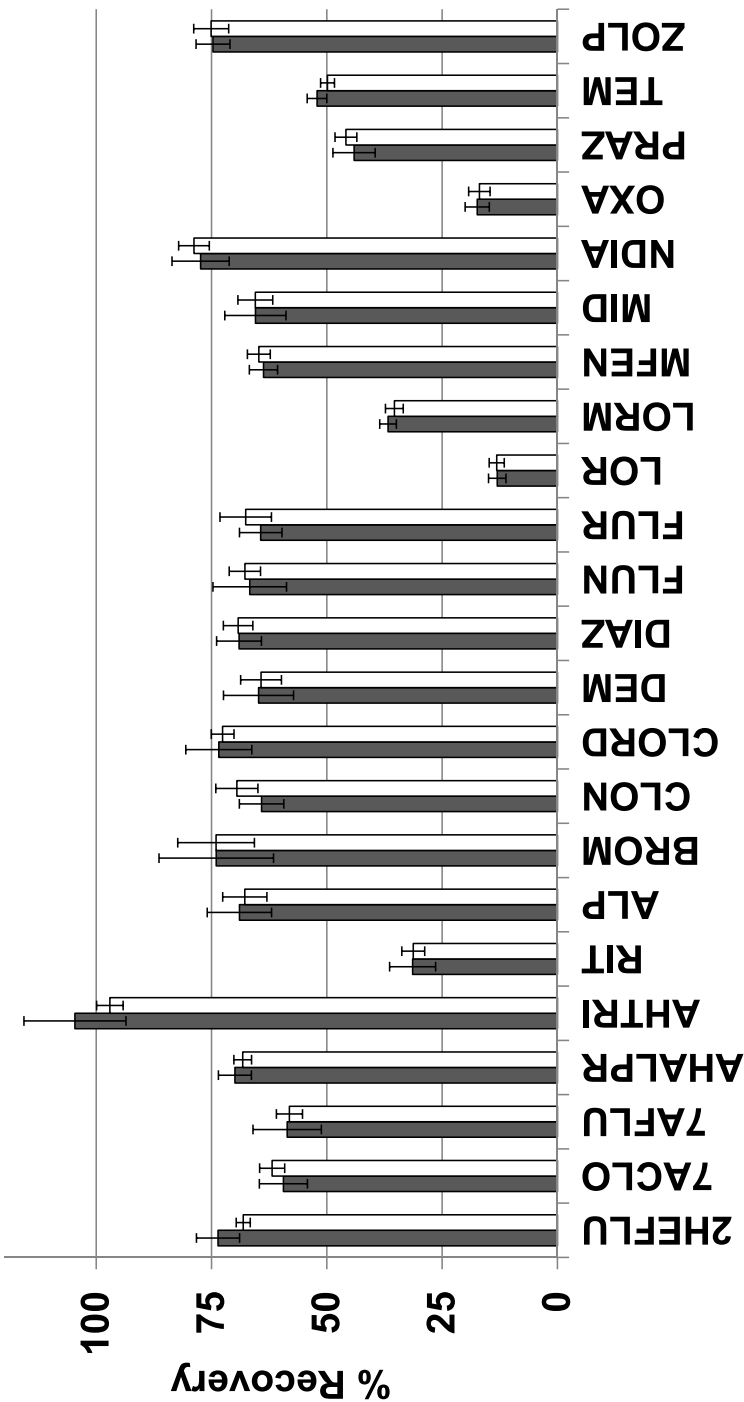


Figure S2. Comparison of recoveries obtained after spiking before (dark bars) or after (light bars) filtration. SPE performed with Oasis HLB (100 mL) and an addition concentration of 100 ng L⁻¹

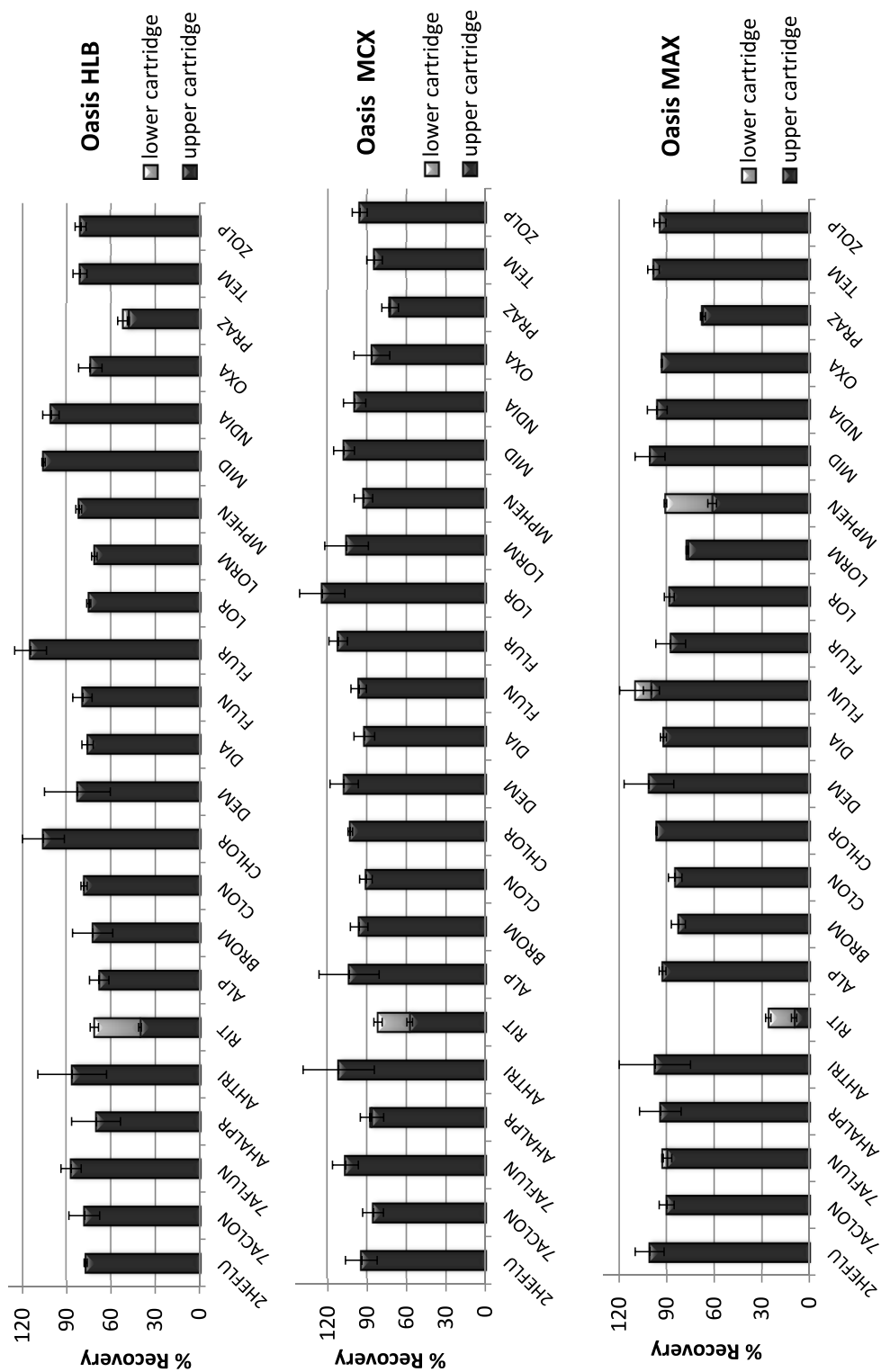


Figure S3. Breakthrough assessment of the different SPE sorbents with 200 mL of effluent sample (n=3) spiked at 100 ng L⁻¹

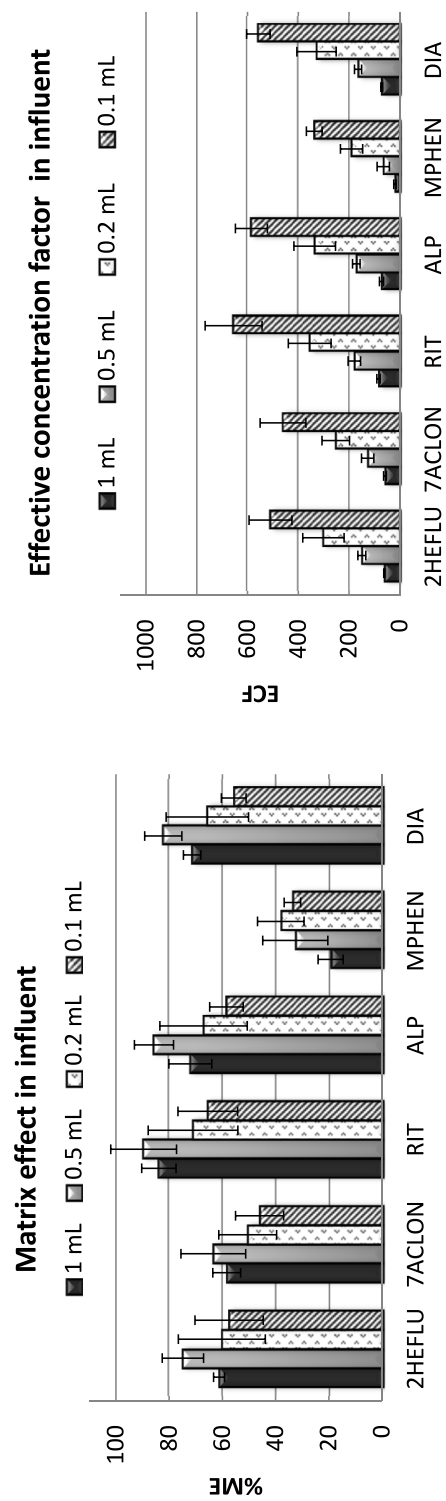


Figure S4. %ME (left) and ECF (right) as a function of the final extract volume obtained with spiked influent wastewater (100 ng L⁻¹). See definition of %ME and ECF in section 2.6.



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

Application of polypropylene tubes as single-use and low-cost sorptive extraction materials for the determination of benzodiazepines and zolpidem in water samples

Inés Racamonde, José Benito Quintana, Rosario Rodil*, Rafael Cela

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, IIAA-Institute for Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela R/Constantino, Candeira SN, 15782 Santiago de Compostela, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2014

Received in revised form 13 October 2014

Accepted 30 October 2014

Available online 5 November 2014

Keywords:

Benzodiazepines

Sorbent extraction

Liquid chromatography–mass spectrometry

(LC–MS/MS)

Wastewater analysis

Polypropylene

ABSTRACT

This work presents a method for the simultaneous determination in water of 17 benzodiazepines (BZPs) and a related pharmaceutical (zolpidem) by extraction with low-cost polymeric sorbents followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). Different polymers were considered: polydimethylsiloxane (PDMS), polypropylene (PP), and polyethersulfone (PES), providing the second one (PP) higher responses. Hence, different operational parameters were considered and optimized using PP as polymeric material for the extraction: ionic strength (as NaCl addition), sample pH, sample volume, extraction time, amount of extractant phase, desorption solvent and desorption time. Under the optimized conditions, 70 mL of sample (pH 9) with 30% (w/v) of NaCl was extracted with four PP tubes (10 mm, ≈ 1 mg each) during 14 h at room temperature, the analytes eluted with 1 mL of acetone and the eluate concentrated to dryness, reconstituted in methanol and analyzed by LC–MS/MS. Under these conditions, extraction efficiencies ranged between 41 and 86%, leading to enrichment factors from 574 to 1204. Satisfactory trueness, expressed as relative recoveries, was obtained in the 87–117% range. LOQs ranged from 0.4 to 31 ng L^{−1} and from 2 to 94 ng L^{−1} for river and influent wastewater, respectively. None of the analytes were detected in river water while 6 of them were detected in wastewater samples in concentrations between 4 and 152 ng L^{−1}, being lorazepam and oxazepam the analytes detected at the highest concentration level. Thus, PP may become a good alternative to PDMS or PES for the extraction of basic analytes.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Benzodiazepines (BZPs) are psychoactive drugs whose core structure is the fusion of a benzene and a diazepine rings. The properties of BZPs make them useful in treating, for instance anxiety, insomnia, agitation, seizures, muscle spasms and alcohol withdrawal [1,2]. Long-term BZP use is controversial due to concerns about adverse psychological and physical effects since BZPs are prone to cause tolerance and physical dependence [3–5]. Recently zolpidem (ZOLP) has constituted a new generation of pharmaceuticals synthesized with similar action mechanism as classical BZPs but with different chemical structures and many times this compound is included into the reports about BZP consumption since it was included in the same therapeutical group as classical BZPs (N05-Psycholeptics) [6,7].

Besides health problems from the uncontrolled consumption of BZPs, they may also be an environmental problem, since these compounds are excreted partially unchanged or in the form of metabolites

[8]. Thus, BZPs have been detected in wastewaters [9–15] and surface waters [14–16] in several regions of Europe.

The most frequently method used for the enrichment and determination of BZPs is solid-phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry (LC–MS/(MS)) [8–10, 12–18]. However, SPE requires relative large volumes of sample (ca. 100–500 mL) to obtain low limits of quantification (LOQs) that can be translated in tedious filtration process, high possibilities of SPE cartridge clogging and problems with sample storage. Moreover the volume of organic solvents (10–50 mL each sample) [8–15,17] is high that means an eluate poor concentrated and further steps are required. All these disadvantages can be total or partially solved with the use of microextraction techniques.

Microextraction techniques can offer a lower intake of sample and hazardous organic solvents. Some of the most popular ones are solid-phase microextraction (SPME), developed by Pawliszyn et al. [19] in 1989 and stir-bar sorptive extraction (SBSE), introduced by Baltussen et al. [20] in 1999. Both of them rely on equilibrium extraction of a limited volume of sample (normally lower than 100 mL) with a small sorbent material (typically a few μ L) than can be easily handled, minimizing or even eliminating solvent usage. Despite the high number of

* Corresponding author. Tel.: +34 881 814 263, +34 881 816 035; fax: +34 881 816 027.

E-mail address: rosario.rodil@usc.es (R. Rodil).

applications these techniques have gained in the last years [21–23], the main disadvantage of these procedures is the relatively high price of the extraction devices (SPME fibers and SBSE Twisters®) that involves their reutilization with the associated well-known carry over problems and the decreasing in the extraction efficiency by the chemical and mechanical degradation of the material due to successive uses. Because of this, in 2004, Popp et al. [24] presented an alternative to those devices: the use of disposable bulk silicone (polydimethylsiloxane, PDMS) sorbents for the extraction and concentration of organic compounds in water samples. Rapidly, this new extraction method increased its popularity due to its simplicity and the low price of each device (ca. 0.1 €), so that they could be used in a single and disposable mode, avoiding carry over problems and changes in the extraction efficiency and facilitating parallel extraction of many samples [25–27]. More recently, other sorbent materials with more polar properties, such as polyethersulfone (PES) [28,29] and polypropylene (PP) [28,30] in several formats (membranes, tubes or rods) have also been tested for the same purpose with better response for analytes with these characteristics. PP hollow fibers are widely used as inert solid support for liquid phase microextraction techniques (LPME) since the possibility of immobilizing a few μL of solvent (10–20 μL) in its lumen and pores [31,32], as recently has developed Rezaei et al. [33] for five BZPs in tap water, juices and biological matrix but also it can be used as sorptive material itself for compounds with high K_{ow} and low water solubility through a sorption process instead a liquid liquid mechanism as Müller et al. [34] have pointed. Following this last premise PP tubes as sorptive materials have been tested for the extraction of chloro and bromo toluene derivatives [35] and chlorinated anisoles [30]. So the extraction with polymers is established as a promising alternative for the extraction of organic compounds from water samples, broadening the application field towards more polar compounds.

Thus, the goal of this work was the assessment of the above mentioned three different low-cost disposable materials (PDMS, PES and PP) for the preconcentration of BZPs and ZOLP from water samples prior to their LC-MS/MS determination. The so-developed method would offer an easy-to-perform sample preparation procedure for the environmental determination of BZPs, due to its simplicity and inexpensive character. To the best of our knowledge, this is the first application of sorptive microextraction for BZP determination in environmental samples.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Standards of 2-hydroxy-ethylflurazepam (2HEFLU), α -hydroxy-alprazolam (AHALP), α -hydroxy-triazolam (AHTRI), alprazolam (ALP), chlordiazepoxide (CHLOR), clonazepam (CLON), demoxepam (DEM), diazepam (DIA), flunitrazepam (FLUN), flurazepam (FLUR), lorazepam (LOR), lormetazepam (LORM), midazolam (MID), nordiazepam (NDIA), oxazepam (OXA), prazepam (PRA), temazepam (TEM) and ZOLP tartrate were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA) as 1000 mg L^{-1} solutions (expressed as neutral compounds) in methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN). ALP- d_5 , DIA- d_5 , FLUN- d_7 , NDIA- d_5 , OXA- d_5 , 2HEFLU- d_4 , LOR- d_4 , and ZOLP- d_6 , used as internal standards (ISs), were purchased also from Cerilliant as 100 mg L^{-1} solution in MeOH or ACN. Stock solutions were prepared by dilution of the individual commercial compounds until obtaining a mixture of 18 analytes at 20 mg L^{-1} in MeOH/ H_2O (1:1). In the case of the ISs the stock mixture solution was prepared by dilution of the individual deuterated compounds until obtaining a mix of 5 mg L^{-1} in MeOH/ H_2O (1:1). Successive dilutions of these mixtures were performed to the desired concentrations necessary to spike the samples and to prepare the calibration curves.

LC-grade ACN, acetone and MeOH, glacial acetic acid (100%), hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) were supplied by

Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride (NaCl) was supplied by VWR (Llinars del Vallès, Spain). Ultrapure water was obtained in the laboratory by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A-10 system (Millipore, Bedford, MA, USA). Nitrocellulose filters (pore size of 0.45 μm) and glass fiber pre-filters were purchased from Millipore.

PDMS flexible cord, with a diameter of 2 mm, was obtained from Goodfellow (Huntingdon, UK), Accurel Q3/2 PP (internal diameter of 0.6 mm, wall thickness of 0.2 mm) and PES (external diameter of 0.7 mm) tubular membranes were obtained from Membrana GmbH (Wuppertal, Germany). Pieces of these polymers with a length of 10 mm were manually cut with a scalpel, which represents a mass of sorbent of ca. 1 mg for PES and PP and of ca. 30 mg for PDMS. These tubes/rods were cleaned with MeOH by manual shaking for several minutes and then stored in clean solvent. Just prior to their use, they were dried with a lint-free tissue.

2.2. Samples

Grab wastewater samples of influent and effluent were taken during October 2013 from a local wastewater treatment plant (WWTP), also 24 h composite influent samples were collected in March 2014. The WWTP is located in the northwest of Spain serving a population around 130,000 inhabitants. Grab river samples were taken at river Sar (Santiago de Compostela, Spain) in October 2013.

Samples were collected in 250 mL amber glass bottles previously rinsed with MeOH, ultrapure water and finally with the sample. They were stored in the dark at 4 °C and analyzed prior 12 h after sampling to avoid any kind of degradation. Before analysis, samples were firstly filtered through a glass pre-filter and then with a 0.45 μm nitrocellulose filter.

2.3. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

The liquid chromatograph used in this work is equipped with two ProStar 210 high-pressure mixing pumps (Varian, Walnut Creek, CA, USA), a Metachem Technologies vacuum membrane degasser (Bath, UK), and an autosampler and a thermostated column compartment ProStar 410 module (Varian). A Synergi Fusion RP column (100 mm \times 2.0 mm with 4 μm particle diameter and 80 Å of pore size, Phenomenex, CA, USA) was selected for the analysis. It was protected with a guard column (4 \times 2 mm) of the same stationary phase (Phenomenex). Temperature was maintained at 35 °C. The injection volume was set to 10 μL . Analytes were separated using a flow rate of 0.2 mL min^{-1} of water (A) and MeOH (B), both containing 0.1% of acetic acid. The gradient was as follows: initial conditions 40% B; 0–20 min linear gradient to 50% B; 20–21 min, linear gradient to 100% B; 21–24 min isocratic conditions at 100% B and finally return to the initial conditions of 40% B with 5 additional minutes for column re-equilibration. The total run time is 29 min.

The LC instrument was coupled to a Varian 320-MS triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI) operating in positive mode. The ionization source working parameters were as follows: needle voltage 5000 V, ionization source temperature 50 °C, drying gas temperature (N_2) 200 °C, nebulizer gas pressure (N_2) 55 psi, drying gas pressure (N_2) 20 psi, collision gas pressure (Ar, 99.999%, Carburos Metálicos, Spain) 1.5 mTorr and centroid mode for acquisition. Nitrogen was provided by a nitrogen generator (Domnick Hunter, Durham, UK). Instrument control and data acquisition were performed with the Varian MS Workstation 6.9 software.

Determination of BZPs was performed by recording two transitions for each analyte and just one for each IS in the multiple reaction monitoring mode (MRM) according to the 2002/657/EC decision [36]. Specific ESI-MS/MS parameters for each analyte are listed in Table 1. Validation parameters of the instrumental method were described in a previous work [18].

Table 1
LC–MS/MS experimental parameters.

Compound	ISs	t _R (min)	MRM transition quantifier ^a	MRM transition qualifier ^a	Transition ratios ± tolerance ^b
ZOLP	ZOLP-d ₆	5.83	308.4 (92) → 235 (28)	308.4 (92) → 263 (20.5)	2.4 ± 0.6
DEM	FLUN-d ₇	6.62	287 (72) → 269 (23.5)	287 (72) → 124 (32)	1.6 ± 0.3
CHLOR	NDIA-d ₅	7.21	300 (56) → 281.9 (21.5)	300 (56) → 282.9 (13)	1.1 ± 0.2
FLUR	NDIA-d ₅	8.24	388.4 (72) → 314.8 (17.5)	388.4 (72) → 317 (13.5)	6.7 ± 2.0
MID	ALP-d ₅	8.36	326.3 (96) → 291 (21.5)	326.3 (96) → 249 (28)	4.4 ± 1.1
CLON	ALP-d ₅	8.94	316 (84) → 270 (22.5)	316 (84) → 214 (34)	4.1 ± 1.0
AHTRI	ALP-d ₅	9.37	359 (80) → 331 (24.5)	359 (80) → 176 (22)	1.1 ± 0.2
AHALP	AHALP-d ₅	9.61	352.3 (88) → 216 (36.5)	325.3 (88) → 140 (32)	1.9 ± 0.4
FLUN	FLUN-d ₇	10.41	314 (80) → 268 (23)	314 (80) → 239 (31)	2.7 ± 0.7
OXA	OXA-d ₅	10.8	287.3 (32) → 241 (21.5)	287.3 (32) → 269 (12)	1.4 ± 0.3
2HEFLU	2HEFLU-d ₄	12.34	333.3 (84) → 109 (23)	333.3 (84) → 315 (12.5)	2.3 ± 0.6
LOR	LOR-d ₄	12.34	321 (56) → 274.9 (18.5)	321 (56) → 302.9 (11.5)	2.0 ± 0.5
ALP	ALP-d ₅	12.42	309 (80) → 205 (37.5)	309 (80) → 281 (23)	1.4 ± 0.3
TEM	OXA-d ₅	12.78	301.3 (52) → 254.9 (19.5)	301.3 (52) → 283 (12)	2.4 ± 0.6
LORM	NDIA-d ₅	14.66	335 (52) → 288.9 (18)	335 (52) → 317 (11)	3.9 ± 0.1
NDIA	NDIA-d ₅	14.72	271.2 (84) → 140 (22)	271.2 (84) → 165 (21.5)	1.8 ± 0.5
DIA	DIA-d ₅	18.05	285.2 (80) → 153.9 (20.5)	285.2 (80) → 193 (25)	1.1 ± 0.2
PRA	ZOLP-d ₆	23.22	325.3 (68) → 271 (17.5)	325.3 (68) → 140 (32)	3.9 ± 1.0
ZOLP-d ₆		5.71	314 (92) → 235 (28)		
AHALP-d ₅		9.36	330 (88) → 221 (36.5)		
FLUN-d ₇		9.49	321 (80) → 275 (23)		
OXA-d ₅		10.6	292 (32) → 246 (21.5)		
2HEFLU-d ₄		12.22	337 (84) → 113 (23)		
LOR-d ₄		11.29	327 (56) → 281 (18.5)		
ALP-d ₅		12.39	314 (80) → 286 (23)		
NDIA-d ₅		14.3	276 (84) → 140 (22)		
DIA-d ₅		17.7	290 (80) → 198 (25)		

^a m/z precursor (capillary voltage/V) → m/z product ion (collision energy/V).

^b MRM transition ratios and tolerances were established according to the 2002/657/EC directive [36].

2.4. Sorptive extraction

Under optimized conditions, aliquots (70 mL) of water spiked with ISs at 100 ng L⁻¹ level and adjusted to pH 9 with a 1 M NaOH solution and 21 g of NaCl (30% w/v) were placed inside 120 mL glass crimp-cap vials containing a PTFE-magnetic stir bar. Four PP tubes (10 mm length each) were exposed directly to the water sample under magnetic stirring (900 rpm) at room temperature during 14 h. After that, PP tubes were removed from the vial using tweezers, washed with ultrapure water and dried with a lint-free tissue. For solvent desorption, the four PP tubes were placed in a 2 mL clear screw-cap vial and 1 mL of acetone was added. After the desorption period (5 min) the vial was opened, the tubes removed and the organic solvent evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen. The extract was reconstituted with 50 µL of MeOH and injected into the LC–MS/MS system.

3. Results and discussion

3.1. Selection of sorbent material

The first parameter considered in the sorptive extraction of the BZPs from water samples was the selection of the sorbent material. In the present work, three materials with different polarities were tested: PES, PP and PDMS. Thus, sorptive experiments with the three polymers were performed as follows: a 10 mm rod/tube, previously rinsed with MeOH, was placed in a 120 mL vial containing 100 mL of ultrapure water adjusted at pH 9 (given the basic character of most BZPs), spiked at 1 ng mL⁻¹ with the analytes. Another set of experiments with the addition of NaCl (20%, w/v) was also considered. Samples were stirred overnight (ca. 14 h) at room temperature. After that extraction time, the sorbent device was removed from the vial using tweezers, dried with a lint-free tissue and placed into a 200 µL insert. Desorption was performed with 100 µL of MeOH during 5 min. Finally the sorbent material was removed and the MeOH extract injected into the LC–MS/MS system.

For most compounds PP showed a better ability for their extraction from water samples (Fig. 1). For those compounds containing a nitro moiety (CLON and FLUN) statistically equal responses (Student-*t* test, 95% confidence level) were obtained with PES and PP. In the case of MID, PDMS and PP showed the best results. Therefore, PP was selected for further experiments.

When NaCl was added to the sample a significant increase in the response for all compounds was obtained. On the other hand, the same behavior was observed with the different materials, except for CLON and FLUN. For these two compounds the presence of an inert salt led to a greater increase in the response using PP than using PES tubes. So, PP also provides the highest signal (Fig. S1) when NaCl is added to the sample. Since that, the effect of NaCl addition was considered more in detail in the following section.

3.2. Optimization of the extraction conditions

3.2.1. Effect of sample pH and ionic strength

The effect of sample pH (adjusted with a solution 1 M of NaOH or HCl) and ionic strength (as NaCl addition) was studied by means of a Central Composite experimental Design (CCD) with four replicates of the central point (i.e. 12 experiments). Experiments were performed with 70 mL of ultrapure water, spiked at 1 ng mL⁻¹. A 10 mm PP rod was stirred during 14 h at 900 rpm. Responses (peak areas) measured for each compound were processed with the Statgraphics Centurion 16.1 software (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA). The experimental domain and an overview of standardized main effects and quadratic terms significance for each compound are provided in Table 2.

The percentage of NaCl had a positive effect in the response of BZPs, being statistically significant for most analytes (Table 2, Fig. S2). This behavior is explained on the basis of the well-known salting out effect [23, 28]. Moreover, the second-order term of NaCl percentage was statistically significant for CLON, DEM, LOR, OXA, TEM, and ZOLP meaning that the response is not linear (Fig. S2b–d). As expected, the sample pH showed a statistically significant positive and non-linear effect for most of the analytes (Table 2, Fig. S2a). Since BZPs are basic compounds

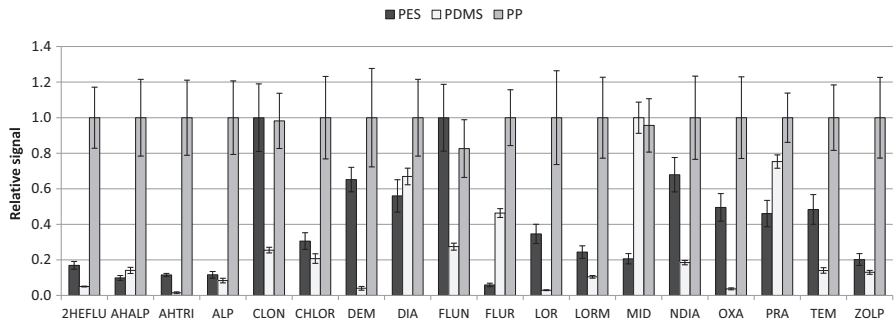


Fig. 1. Comparison between the signal obtained for the three materials (PP, PDMS and PES) in the extraction of 100 mL of ultrapure water spiked at 1 ng mL⁻¹ level (n = 3). Data are normalized respect the most intense signal for each compound.

with pK_a values between 2 and 8, for most compounds extraction efficiency increases as the pH increases around the pK_a value and it remains constant when pH > pK_a, which also explains the curvature of the sample pH effect, i.e. the statistical significance of the second-order term of pH (Fig. S2a). On the other hand, for those compounds with an acidic group, with a pK_a around 10 (DEM, LOR, LORM, OXA and TEM), the sample pH was not statistically significant (DEM, OXA and TEM) (Fig. S2b) or even statistically significant with a negative effect (LOR and LORM) (Fig. S2d). In the case of those compounds with nitro moieties (CLON and FLUN) (Fig. S2c), the sample pH was a statistically significant factor with a non-linear negative effect. The low response of the nitroaromatic compounds at higher pH could be most likely a result of their instability in basic solution [37]. Finally, interactions between NaCl and pH terms were not statistically relevant for any of the analytes.

In view of the above results, further extractions were performed with samples containing a 30% of NaCl and adjusted at pH 9, as a compromise.

3.2.2. Sample volume

Three different sample volumes were tested (8, 18 and 70 mL of sample) according to the capacity of typical glass crimp-cap vials and

considering the increase of volume after NaCl addition. These experiments were performed by triplicate with fortified ultrapure water (1 ng mL⁻¹ of each analyte) at pH 9 and with a 30% NaCl added, stirred overnight. Analyte desorption was carried out using 100 µL of MeOH during 5 min.

The results of these experiments showed that the response increased as the sample volume raised from 8 to 70 mL (Fig. 2). Although the increase was not linearly correlated to sample volume, a volume of 70 mL was selected for further experiments in order to maximize method sensitivity.

3.2.3. Extraction time

Extraction time profiles were evaluated by triplicate experiments with 70 mL of spiked ultrapure water samples (1 ng mL⁻¹) adjusted at pH 9 and containing 21 g NaCl (30% w/v) with a stirring speed of 900 rpm at room temperature for a period of time between 1 and 24 h. Desorption was performed with 100 µL of MeOH for 5 min.

Extraction kinetics plots were then obtained by fitting the areas obtained to the equation proposed by Chen and Pawliszyn [38] for equilibrium situations in SPME, applying the same approach than in our previous works [29,39]. Fig. 3 exemplarily shows the extraction kinetics plots for four representative compounds (the remaining plots are similar to these ones). As it can be observed in Fig. 3 for OXA and DIA, equilibrium was not reached for most analytes even after a sampling time of 24 h. Only for CLON, FLUN and DEM the equilibrium was reached before 24 h (ca. 17 h). Therefore, as a compromise between sample throughput and sensitivity, extraction time was set to 14 h. Although this extraction time is quite long, it was selected to simplify the method, since several simultaneous extractions (eg. 15–60 with a multiposition magnetic stirrer) can be performed in an unattended way overnight.

3.2.4. Number of PP tubes

The effect of the amount of extractant phase, i.e. the number of 10 mm PP tubes, on the extraction efficiency was studied. Thus, extractions with one to four 10 mm PP tubes were performed under the previously optimized conditions. The desorption step was performed with 1 mL of MeOH to assure the completely immersion of the PP tubes. The results, summarized in Fig. 4, showed that the extraction efficiency increases as the number of PP tubes increases, achieving extraction efficiencies above 50% except for DEM (41%), when 4 tubes are used. Hence, four PP tubes of 10 mm each were used in further experiments.

3.3. Optimization of the desorption process

In the final step of method optimization, desorption solvents (MeOH and acetone) and time (5 and 15 min) were considered. The desorption volume was increased respective to previous assays, as it was not feasible to accommodate the four PP tubes into an insert, and a larger solvent

Table 2
Experimental domain of the central composite design (CCD) and relative effects (positive or negative) including second order terms obtained.

Factor	pH (A)	%NaCl (B)	Second order terms		
Lower level	2	0			
Central level	7	15			
Higher level	12	30	AA	BB	AB
ZHEFLU	++	++	--	+	+
AHALP	++	++	--	-	+
AHTRI	++	++	--	+	+
ALP	++	++	--	+	+
CLON	--	++	--	+	-
CHLOR	++	++	--	-	+
DEM	-	++	-	++	+
DIA	++	++	--	-	+
FLUN	--	++	--	+	-
FLUR	++	+	--	-	-
LOR	--	++	-	++	-
LORM	--	++	-	-	-
MID	++	++	--	-	-
NDIA	++	++	--	+	-
OXA	+	++	-	++	-
PRA	++	+	--	-	-
TEM	+	++	--	++	-
ZOLP	++	++	--	--	-
Selected conditions	9	30			

Double mark means a statistically significant factor (95% of confidence level).

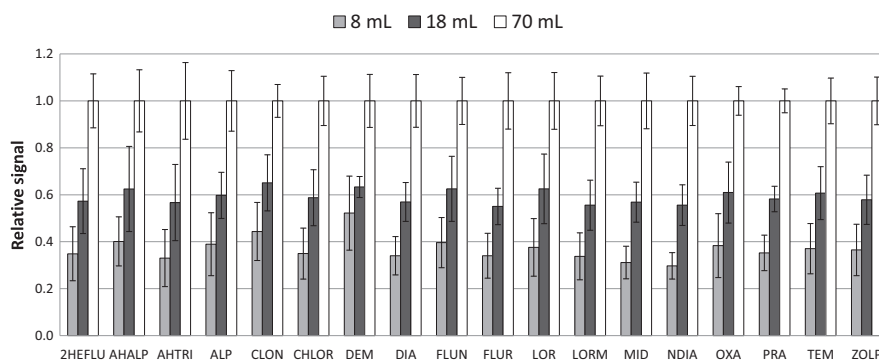


Fig. 2. Comparison between three different sample volumes (8, 18 and 70 mL) using a PP tube as extractant material ($n = 3$). Data normalized to the highest signal.

amount was required to completely cover them. Triplicate extractions were performed with ultrapure water spiked at 1 ng mL^{-1} in the conditions previously described. After the extraction, three consecutive desorptions during 5 or 15 min, with 1 mL of MeOH or acetone were done. Extracts were evaporated to dryness under a N_2 stream and reconstituted with $50 \mu\text{L}$ of MeOH.

With both solvents, MeOH and acetone, even with 5 min desorption time, normalized responses for the 2nd fraction remained below 5% of those measured for the 1st one and most analytes were not detected in the 3rd desorption fraction (data not shown). On the other hand, similar recoveries were obtained with MeOH and acetone. Therefore, acetone was selected for further studies, as it is more volatile than MeOH and it is faster and more easily concentrated. Thus, desorption was finally performed with 1 mL of acetone during 5 min. This solvent was finally evaporated to dryness and reconstituted with $50 \mu\text{L}$ of MeOH for injection in the LC-MS/MS system, as to maximize sensitivity.

3.4. Method performance

3.4.1. Linearity, precision, extraction efficiency and enrichment factor

Linearity was evaluated by duplicate extraction of ultrapure water aliquots spiked at ten concentration levels in the LOQ-1000 ng L^{-1} range, using the appropriate isotopically labeled IS (see Table 1) at 100 ng L^{-1} level under the optimized conditions described before. As shown in Table 3, the method was linear up to 1000 ng L^{-1} for all compounds, but PRA (where the linear range was limited to 500 ng L^{-1}), with determination coefficients (R^2) higher than 0.9987. Limits of quantification (LOQs) were calculated as 10 times the signal-to-noise ratio from the lowest spiked concentration level in ultrapure water, obtained values were in the range between 0.2 and 20 ng L^{-1} (Table 3).

The precision of the method was evaluated at two concentration levels by extracting ultrapure water samples spiked at 20 and 200 ng L^{-1} ($n = 6$). The results, in terms of relative standard deviation

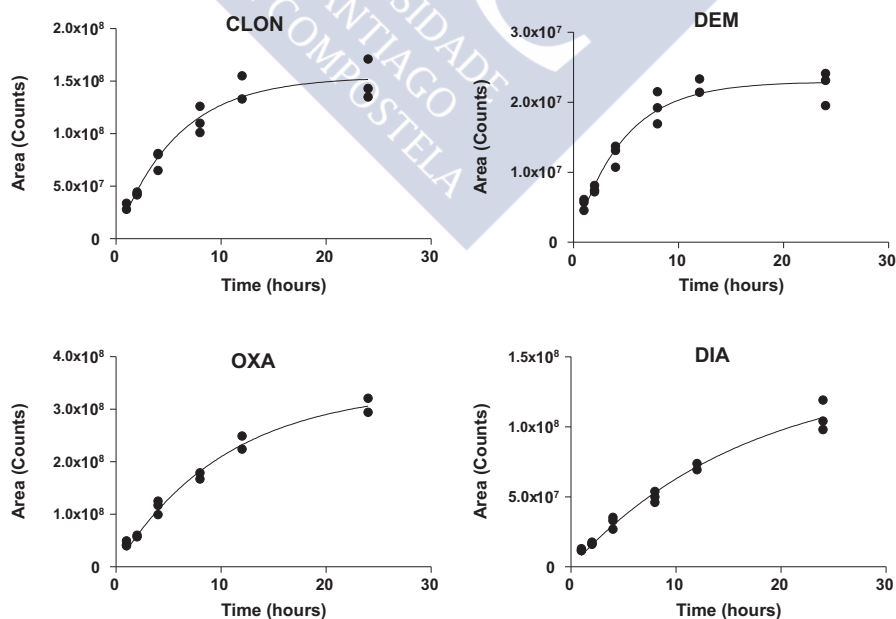


Fig. 3. Extraction kinetics plots.

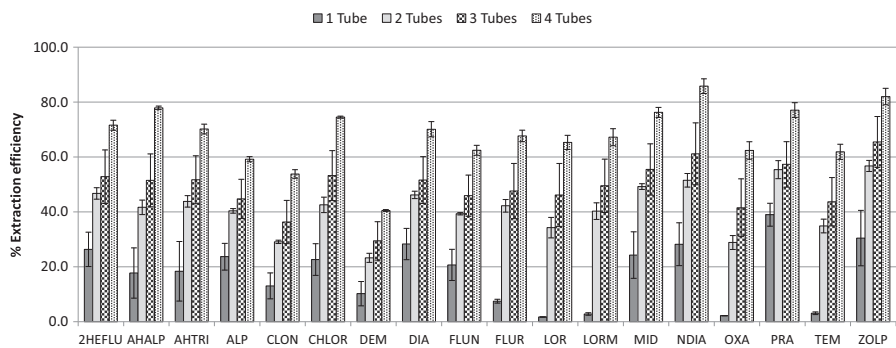


Fig. 4. Effect of the number of PP tubes on the extraction efficiency. 70 mL of sample with 30% of NaCl and pH = 9 were extracted overnight ($n = 3$).

(RSD), were lower than 15% (Table 3). So, the precision of the method was deemed acceptable keeping in mind that different portions of manually cut sorptive materials were used.

The extraction efficiency of the pre-concentration method was also calculated by comparing the LC–MS/MS peak areas of an ultrapure water sample spiked at 200 ng L⁻¹ extract ($n = 6$) with those of a standard solution prepared in MeOH (injected directly in the LC–MS/MS). Calculated extraction efficiencies ranged from 41 to 86%, leading to enrichment factors between 574 and 1204 times (Table 3).

3.4.2. Matrix effects, trueness and limits of quantification with real sample matrices

The extraction efficiency of sorptive extraction techniques can be affected by the composition of the sample matrix [40,41]. Moreover, the presence of organic matter and other matrix compounds in the extracts leads to matrix effects (normally signal suppression) in LC–MS/MS, particularly when the ionization source is ESI [42,43]. Therefore, overall matrix effects (during extraction and at LC–MS/MS) were estimated by comparing the responses obtained for spiked samples (ultrapure water and water samples of river, effluent and influent) ($n = 3$). Effluent and river samples were spiked with the compounds at 50 ng L⁻¹ level and influent samples at 100 ng L⁻¹ level and non-spiked samples were also analyzed and considered for calculations. Hence, a value of matrix effects of 100% would indicate no matrix effects, lower values

translate into lower extraction efficiency or/and signal suppression and higher values signal enhancement. Significant matrix effects were observed in the three matrices considered (Fig. S3). The matrix effects for river were the lowest with values between 80 and 60%, except for PRA (50%). In the case of effluent wastewater the matrix effects were slightly higher than those in river water ranged from 65 to 30%, again PRA was the compound more affected by matrix effects (diminution of the signal up to 80%). As it can be predictable the highest matrix effects were obtained for influent wastewater samples (ca. 10–46%), due to its higher organic content. Anyway, the use of ISs permits compensating the matrix effects and good trueness values, expressed as relative recovery, were obtained in the range of 87–117% with RSDs below 20% (Table 4).

LOQs in wastewater and river samples were calculated based on the LOQs in ultrapure water taking into account the matrix effects (Table 4). The LOQs ranged between 0.4 and 31 ng L⁻¹ for river water whereas for influent the LOQs were higher (2–94 ng L⁻¹) due to matrix effects. The LOQs in this work for the mentioned compounds are in the same order or lower than those obtained by SPE [10,11,44–46], which only include the determination of four to seven BZPs, mainly OXA, LOR, DIA and ALP. Compared to our previous work using SPE–LC–MS/MS [18], only the hydroxylated BPZ metabolites (AHALP and AHTRI) and BZPs with nitro moieties (FLUN and CLON) present significant higher LOQs in influent wastewater.

Table 3
Performance figures with ultrapure water.

Compound	Linearity (R ²) ^a	%RSD		Extraction efficiency (%)	Enrichment factor	LOQ (ng L ⁻¹)
		20 ng L ⁻¹	200 ng L ⁻¹			
2HEFLU	0.9998	12	2	72	1008	6
AHALP	0.9990	7	6	78	1092	20
AHTRI	0.9990	8	4	70	980	10
ALP	0.9990	11	2	59	826	3
CLON	0.9991	9	5	54	756	10
CHLOR	0.9990	9	4	75	1050	3
DEM	0.9993	12	9	41	574	10
DIA	0.9992	7	3	70	980	3
FLUN	0.9991	6	6	62	868	10
FLUR	0.9990	14	6	68	952	3
LOR	0.9990	5	4	65	910	3
LORM	0.9992	12	4	67	938	0.8
MID	0.9990	11	11	76	1064	1
NDIA	0.9992	12	4	86	1204	2
OXA	0.9989	12	10	62	868	3
PRA	0.9993 ^b	9	7	77	1078	0.2
TEM	0.9987	13	8	62	868	1
ZOLP	0.9991	7	3	82	1148	1

^a LOQ-1000 ng L⁻¹ (ISs: 100 ng L⁻¹).
^b LOQ-500 ng L⁻¹ (ISs: 100 ng L⁻¹).

Table 4
Trueness, precision and limits of quantification for the analysis of river and wastewater samples.

	% Recovery (RSD) ^a			LOQ (ng L ⁻¹)		
	River	Effluent	Influent	River	Effluent	Influent
2HEFLU	113 (8)	112 (20)	116 (1)	8	12	20
AHALP	89 (10)	99 (15)	109 (17)	31	39	71
AHTRI	95 (16)	113 (10)	117 (7)	16	35	46
ALP	109 (4)	109 (14)	98 (17)	5	10	15
CLON	108 (8)	113 (10)	104 (9)	16	35	63
CHLOR	93 (2)	104 (11)	88 (5)	4	6	11
DEM	111 (12)	111 (1)	113 (19)	12	24	55
DIA	107 (3)	109 (5)	92 (10)	4	12	11
FLUN	90 (6)	107 (16)	89 (5)	15	29	94
FLUR	94 (10)	91 (9)	91 (8)	4	7	10
LOR	106 (10)	95 (15)	102 (13)	4	5	5
LORM	94 (8)	90 (17)	89 (6)	1	1	2
MID	87 (2)	109 (3)	102 (10)	2	4	6
NDIA	101 (4)	95 (3)	101 (5)	3	4	4
OXA	99 (2)	105 (5)	101 (12)	4	5	8
PRA	89 (1)	90 (14)	89 (3)	0.4	0.9	2
TEM	95 (12)	97 (4)	97 (9)	2	2	3
ZOLP	105 (9)	111 (5)	109 (10)	2	4	7

^a Samples spiked at 50 ng L⁻¹ level for effluent and river samples, 100 ng L⁻¹ for influent samples, and ISs at 100 ng L⁻¹ level, $n = 3$.

Table 5

Concentrations (ng L^{-1}) of BZPs in wastewater samples (RSD). Those analytes below LOQ in all samples are not included in this table, ($n = 4$).

		LOR	LORM	NDIA	OXA	PRA	TEM
Influent	1	10 (14)	4 (10)	6 (10)	9 (14)	<LOQ	<LOQ
	2	99 (19)	29 (12)	26 (13)	79 (11)	<LOQ	10 (11)
	3	67 (1)	22 (9)	19 (11)	70 (15)	<LOQ	18 (14)
	4 ^a	46 (5)	21 (18)	11 (15)	50 (8)	<LOQ	11 (9)
	5 ^a	40 (7)	19 (20)	13 (11)	37 (9)	<LOQ	10 (6)
	6 ^a	54 (1)	13 (12)	14 (1)	44 (11)	<LOQ	17 (4)
Effluent	6 ^a , (SPE) ^b	63 (10)	10 (15)	13 (14)	48 (8)	<LOQ	18 (5)
	1	78 (10)	21 (3)	15 (9)	70 (8)	7 (9)	15 (8)
	2	78 (17)	25 (5)	16 (5)	91 (3)	4 (20)	18 (7)
	3	103 (6)	42 (11)	25 (11)	152 (19)	6 (20)	36 (15)
	4	68 (1)	33 (4)	25 (2)	110 (24)	5 (3)	20 (13)

^a 24 h composite samples.

^b Sample extracted by SPE, as detailed in [18].

Therefore, this method affords an alternative (to SPE) easy and inexpensive preparation methodology.

3.5. Application to real samples

Once the method was fully validated it was applied to the determination of BZPs in river and wastewater (influent and effluent) samples. Samples were spiked with the IS at 100 ng L^{-1} and extracted with the optimized method, results obtained (in peak area) were interpolated in the corresponding calibration curve made in ultrapure water and the results, in ng L^{-1} , for each compound are presented in Table 5.

Moreover, one of the samples (sample 6 in Table 5) was analyzed using a SPE method already published [18]. The results showed that there are no statistical significant differences between the results obtained by the two methods at the 95% confidence level (t-Student test).

None of the compounds was detected in river samples at levels above the LOQs. Regarding wastewater, as presented in Table 5, five BZPs were found in both effluent and influent wastewater samples whereas PRA was only detected in concentrations over the LOQ in effluent wastewater samples. LOR and OXA were the analytes detected at

the highest concentration levels. An example chromatogram of an influent sample (no. 2 in the Table 5) is presented in Fig. 5. The concentrations detected in wastewater are in agreement with those reported in our previous work using SPE [18]. As compared to other publications, the concentrations of LORM, NDIA and LOR measured are similar to those reported in several countries of Europe [9,15,47]. On the other hand, TEM and OXA were found in this work at concentrations lower than those reported in North Europe [9,10,45,48,49], but similar to those found in East Europe [8] and Spain [11,15].

4. Conclusions

A method based on the combination of low-cost polymeric sorbent extraction followed by LC–MS/MS determination has been developed for the determination of 17 BZPs, metabolites and ZOLP in water samples. Notably, PP has proven to be the best option as compared to PES and PDMS, which are more popular in the literature. Hence, PP may become an interesting alternative for the analysis of basic analytes.

The method shows good performance figures allowing the determination of the analytes at the low ng L^{-1} level and the results are in the same order as those obtained previously with SPE in terms of LOQ, trueness and repeatability but simplifying the procedure and decreasing the cost of the overall process.

Acknowledgments

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (*Ministerio de Economía y Competitividad*), Regional Government (*Xunta de Galicia*) and FEDER funds through: Project no. CTQ2010-18927, CTQ2012-33080 and EM 2012/055; and FPI grant (awarded to Inés Racamonde). We are also grateful to Viaqua for providing access to wastewater samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.10.011>.

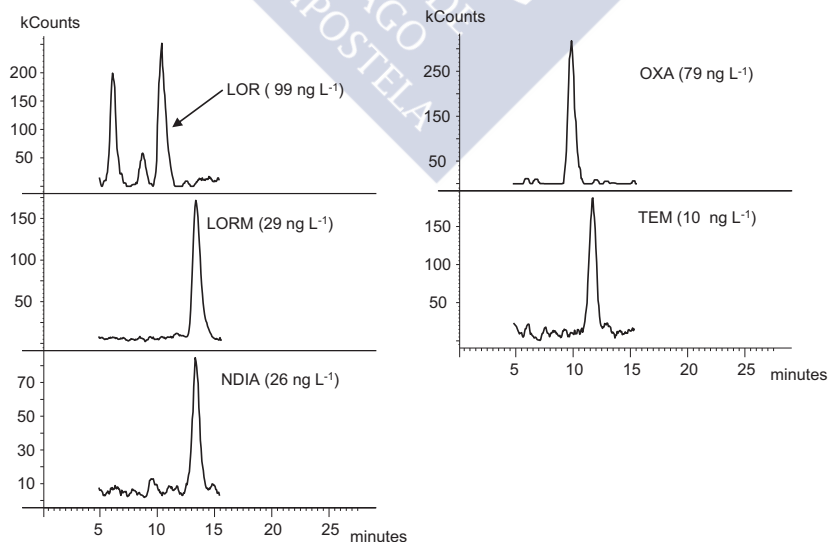


Fig. 5. Chromatogram of influent sample no. 2 (only analytes above LOQ are presented).

References

- [1] J. Flórez, *Farmacología humana* 4th ed (in Spanish) Masson, Barcelona (Spain), 2003.
- [2] J. Riss, J. Cloyd, J. Gates, S. Collins, Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics, *Acta Neurol. Scand.* 118 (2008) 69–86.
- [3] R.J. Baldessarini, Drugs and the treatment of psychiatric disorders: depression and mania, in: J.G. Hardman, et al., (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw Hill, New York, 1996, pp. 431–459.
- [4] C. de las Cuevas, E. Sanz, J. de la Fuente, Benzodiazepines: more "behavioral" addiction than dependence, *Psychopharmacology* 167 (2003) 297–303.
- [5] J.H. Woods, J.L. Katz, G. Winger, Abuse and therapeutic use of benzodiazepines and benzodiazepine-like drugs (New York), *Psychopharmacology*, Raven Press, 1995 (Available at www.acnp.org/g4/GN401000172/CH168.html).
- [6] B. Lemmer, The sleep–wake cycle and sleeping pills, *Physiol. Behav.* 90 (2007) 285–293.
- [7] International Narcotics Control Board (INCB), Psychotropic Substances, Statistics for 2011 Assessments of Annual Medical and Scientific Requirements for Substances in Schedules II, III and IV of the Convention on Psychotropic Substances of 1971, 2013.
- [8] T. Kosjek, S. Perko, M. Zupanc, M. Zanoski Hren, T. Landeka Dragicevic, D. Zigon, B. Kompare, E. Heath, Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment, *Water Res.* 46 (2012) 355–368.
- [9] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, Investigation of drugs of abuse and relevant metabolites in Dutch sewage water by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, *Chemosphere* 89 (2012) 1399–1406.
- [10] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1620–1631.
- [11] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4212–4222.
- [12] Y. Valcárcel, F. Martínez, S. González-Alonso, Y. Segura, M. Catalá, R. Molina, J.C. Montero-Rubio, N. Mastroianni, M. López de Alda, C. Postigo, D. Barceló, Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation, *Environ. Int.* 41 (2012) 35–43.
- [13] J. Bones, K.V. Thomas, B. Paull, Using environmental analytical data to estimate levels of community consumption of illicit drugs and abused pharmaceuticals, *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 701–707.
- [14] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching, *Anal. Chem.* 81 (2009) 898–912.
- [15] S. Esteban, Y. Valcárcel, M. Catalá, M. Castromil González, Psychoactive pharmaceutical residues in the watersheds of Galicia (Spain), *Gac. Sanit.* 26 (2012) 457–459.
- [16] A. Mendoza, M. López de Alda, S. González-Alonso, N. Mastroianni, D. Barceló, Y. Valcárcel, Occurrence of drugs of abuse and benzodiazepines in river waters from the Madrid Region (Central Spain), *Chemosphere* 95 (2013) 247–255.
- [17] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura, Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment, *Water Res.* 45 (2011) 1432–1442.
- [18] I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, E. Villaverde-de-Sáa, R. Cela Torrijos, Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1352 (2014) 69–79.
- [19] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [20] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [21] E. Baltussen, C. Cramers, P. Sandra, Sorptive sample preparation – a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 3–22.
- [22] B. Zygmunt, A. Jastrzebska, J. Namiesnik, Solid phase microextraction – a convenient tool for the determination of organic pollutants in environmental matrices, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 1–18.
- [23] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2642–2666.
- [24] P. Popp, C. Bauer, A. Paschke, L. Montero, Application of a polysiloxane-based extraction method combined with column liquid chromatography to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, *Anal. Chim. Acta.* 504 (2004) 307–312.
- [25] M. van Pinxteren, A. Paschke, P. Popp, Silicone rod and silicone tube sorptive extraction, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2589–2598.
- [26] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, M. Möder, I. Rodríguez, Evaluation of polyethersulfone performance for the microextraction of polar chlorinated herbicides from environmental water samples, *Talanta* 122 (2014) 264–271.
- [27] J. Casado, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, Polyethersulfone solid-phase microextraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for benzotriazoles determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1299 (2013) 40–47.
- [28] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, M. Möder, Evaluation of low-cost disposable polymeric materials for sorptive extraction of organic pollutants in water samples, *Anal. Chim. Acta.* 716 (2012) 119–127.
- [29] E. Villaverde-de-Sáa, I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Ion-pair sorptive extraction of perfluorinated compounds from water with low-cost polymeric materials: polyethersulfone vs polydimethylsiloxane, *Anal. Chim. Acta.* 740 (2012) 50–57.
- [30] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, M. Ramil, R. Cela, Suitability of polypropylene microporous membranes for liquid- and solid-phase extraction of halogenated anisoles from water samples, *J. Chromatogr. A* 1198–1199 (2008) 21–26.
- [31] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1–10.
- [32] J.B. Quintana, I. Rodríguez, Strategies for the microextraction of polar organic contaminants in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1447–1461.
- [33] F. Rezaei, Y. Yamini, M. Moradi, B. Daraei, Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines, *Anal. Chim. Acta.* 804 (2013) 135–142.
- [34] S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 99–106.
- [35] M.L. Carpintero, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, Headspace solid-phase microextraction of halogenated toluenes in environmental aqueous samples with polypropylene microporous membranes, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2825–2831.
- [36] Commission Decision 2002/657/EC, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Lex.* (17/08/2008) 8–36.
- [37] R.E. Shirey, Optimization of extraction conditions and fiber selection for semivolatile analytes using solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 279–288.
- [38] Y. Chen, J. Pawliszyn, Kinetics and the On-site application of standards in a solid-phase microextraction fiber, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5807–5815.
- [39] I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, In-sample derivatization-solid-phase microextraction of amphetamines and ecstasy related stimulants from water and urine, *Anal. Chim. Acta.* 770 (2013) 75–84.
- [40] R. Rodil, J.B. Quintana, T. Reemtsma, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of nonionic organophosphorus flame retardants and plasticizers in wastewater samples, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3083–3089.
- [41] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [42] A. Klopfer, J.B. Quintana, T. Reemtsma, Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 153–160.
- [43] T. Reemtsma, Liquid chromatography–mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 477–501.
- [44] L. Bijlsma, E. Emke, F. Hernández, P. de Voogt, Performance of the LTQ-Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water, *Anal. Chim. Acta.* 768 (2013) 102–110.
- [45] M. Östman, J. Fick, E. Näsström, R.H. Lindberg, A snapshot of illicit drug use in Sweden acquired through sewage water analysis, *Sci. Total Environ.* 472 (2014) 862–871.
- [46] S. Grujić, T. Vasiljević, M. Lausović, Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4989–5000.
- [47] C. Repice, M.D. Grande, R. Maggi, R. Pedrazzani, Licit and illicit drugs in a wastewater treatment plant in Verona, Italy, *Sci. Total Environ.* 463–464 (2013) 27–34.
- [48] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8036–8059.
- [49] A. Wick, G. Fink, A. Joss, H. Siegrist, T.A. Ternes, Fate of beta blockers and psychoactive drugs in conventional wastewater treatment, *Water Res.* 43 (2009) 1060–1074.

SUPPLEMENTARY MATERIAL TO:

*Application of polypropylene tubes as single-use and low-cost
sorptive extraction materials for the determination of
benzodiazepines and zolpidem in water samples.*

Inés Racamonde, José Benito Quintana, Rosario Rodil *, Rafael Cela.

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, IIAA-Institute for
Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela R/ Constantino
Candeira SN 15782 Santiago de Compostela, Spain.

*Corresponding author. E-mail address: rosario.rodil@usc.es (R. Rodil)

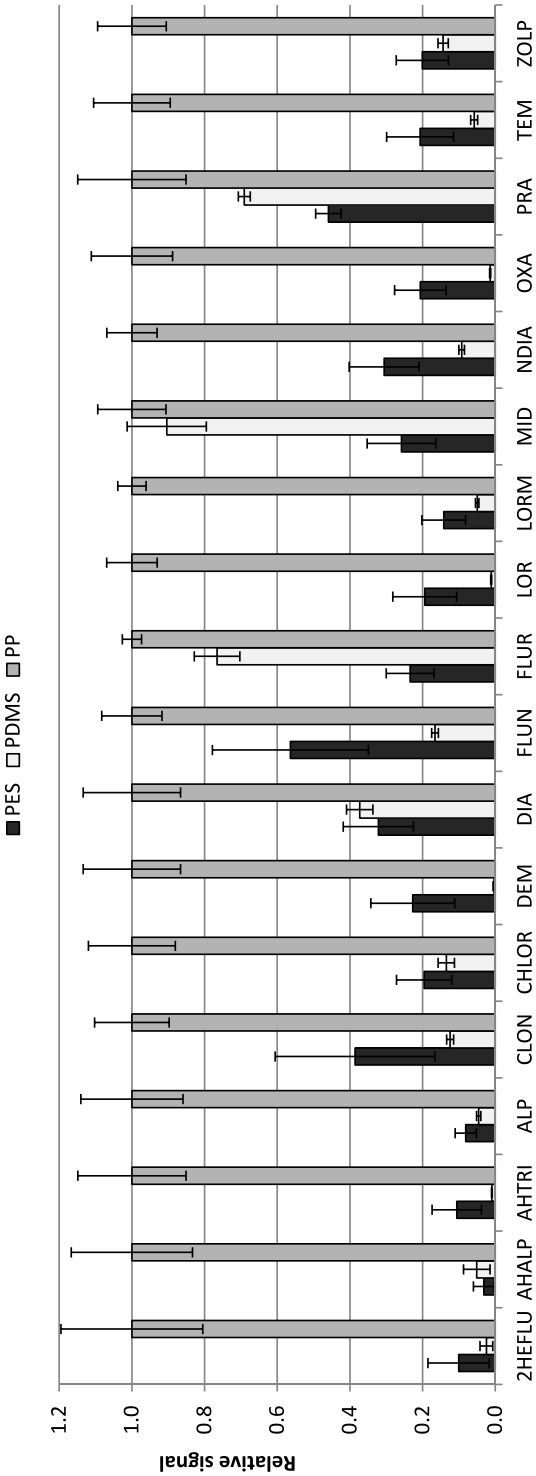


Figure S1. Comparison between the signal obtained for the three materials (PP, PDMS and PES) in the extraction of 100 mL of ultrapure water spiked at 1 ng mL⁻¹ level and 20% of NaCl (n=3). Data are normalized respect the PP signal.

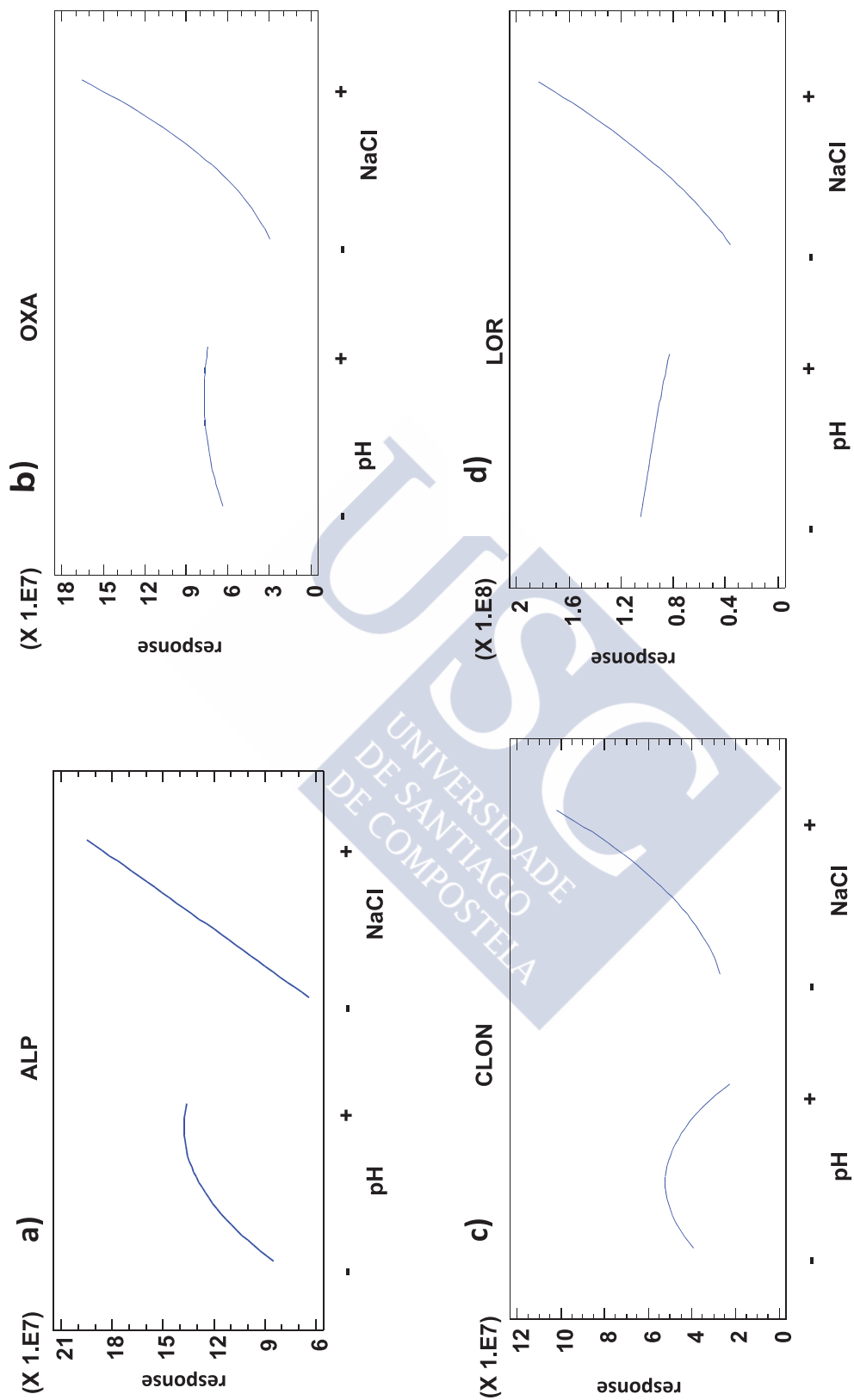


Figure S2.Main effects plots for selected compounds

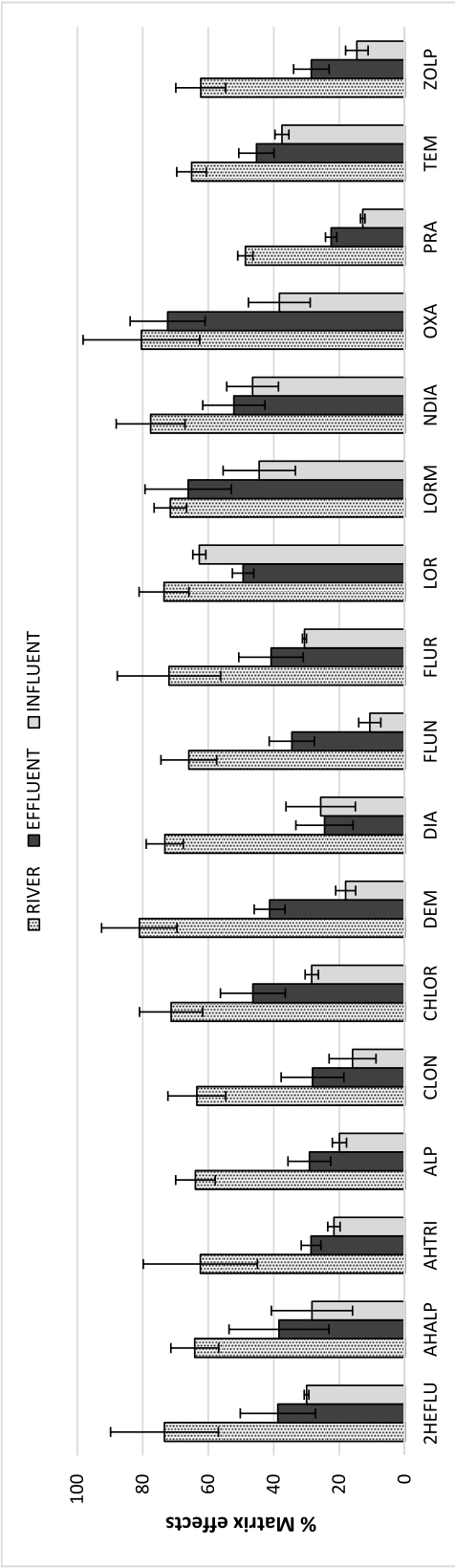


Figure S3. Matrix effects observed with 70 mL of water spiked at 50 ng L⁻¹ level for effluent and river samples and 100 ng L⁻¹ for influent using four PP tubes (n=3)



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Fabric phase sorptive extraction: A new sorptive microextraction technique for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs from environmental water samples



Inés Racamonde^a, Rosario Rodil^a, José Benito Quintana^{a,*}, Benigno José Sieira^a, Abuzar Kabir^{b,**}, Kenneth G. Furton^b, Rafael Cela^a

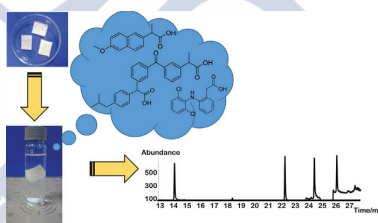
^a Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, IIAA-Institute for Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela, R/ Constantino Candeira SN, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^b International Forensic Research Institute, Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University, 11200 SW 8th Street, Miami, FL 33199, USA

HIGHLIGHTS

- Fabric phase sorptive extraction: new sorbent-based microextraction technique.
- Parameters on FPSE of NSAIDs from environmental water optimized.
- FPSE combines great extraction efficiency and fast kinetics.
- Good performance with negligible matrix effects in complex water.
- Simple, inexpensive, green and readily field deployable.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2014

Received in revised form 12 December 2014

Accepted 23 January 2015

Available online 29 January 2015

Keywords:

Fabric phase sorptive extraction (FPSE)

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

Derivatization

Wastewater analysis

ABSTRACT

Fabric phase sorptive extraction (FPSE) is a new, yet very promising member of the sorbent-based sorptive microextraction family. It has simultaneously improved both the extraction sensitivity and the speed of the extraction by incorporating high volume of sol–gel hybrid inorganic–organic sorbents into permeable fabric substrates. The advantages of FPSE have been investigated for the determination of four non-steroidal anti-inflammatory drugs, ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac, in environmental water samples in combination with gas chromatography–mass spectrometry. Initially, the significance of several parameters affecting FPSE: sorbent chemistry, matrix pH and ionic strength were investigated using a mixed level factorial design ($3^1 \times 2^2$). Then, other important parameters e.g., sample volume, extraction kinetics, desorption time and volume were also carefully studied and optimized. Due to the high sorbent loading on the FPSE substrate in the form of ultra-thin coating and the open geometry of the microextraction device, higher mass transfer of the target analytes occurs at a faster rate, leading to high enrichment factors in a relatively short period of time (equilibrium times: 45–100 min). Under optimal operational conditions, the limits of detection ($S/N=3$) were found to be in the range of 0.8 ng L^{-1} to 5 ng L^{-1} . The enrichment factors ranged from 162 to 418 with absolute extraction efficiencies varied from 27 to 70%, and a good trueness (82–116% relative recoveries) indicating that the proposed method can be readily deployed to routine environmental pollution monitoring. The proposed method

* Corresponding author. Tel.: +34 881814263/16035; fax: +34 881816027.

** Corresponding author. Tel.: +1 3053482396; fax: +1 3053484172.

E-mail addresses: jb.quintana@usc.es (J.B. Quintana), akabir@fiu.edu (A. Kabir).

was successfully applied to the analysis of target analytes in two influent and effluent samples from a wastewater treatment plant and two river water samples in Spain.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Solid-phase extraction (SPE) has become the reference extraction technique for the determination of trace organic pollutants, including pharmaceuticals, in wastewater and other environmental waters [1,2]. However, it still holds some drawbacks, such as the need to process relatively high sample volumes (100–5000 mL) in order to reach the (sub-) ng L^{-1} limits of quantification (LOQs) required in many cases [3–6]. Moreover, the volume of organic solvents needed to condition and elute the cartridges (typically 5–50 mL) is also relatively large. These considerations, among some others, contributed to the quick development of alternative microextraction techniques, aiming to reducing sample volume (typically in the 5–100 mL range) and elution solvent (typically in the 0–1 mL range) intake. Contrary to SPE, microextraction techniques are based on the principle of analyte partitioning between the extraction sorbent and the sample matrix rather than exhaustive extraction [7]. These microextraction techniques can be divided in two groups: those using a small sorbent material (sorbent-based sorptive microextraction) and those based on a small volume of solvent (solvent-based microextraction). Among them, the first approach, based on a sorbent, is more popular and has reached the commercial status in several formats, because of its much simpler handling [7].

The first and, to date, the most popular microextraction technique is solid-phase microextraction (SPME) [8]. The commercial format of SPME consists of a fiber covered with a small amount of sorbent, which comes in contact to the sample containing the target analyte(s) for a specific time and then is directly desorbed in the gas chromatograph (GC) for analysis. SPME can thus be considered a fully solventless technique if combined to GC, while combination with liquid chromatography has not been so successful. Its main limitations are the cost of commercial fibers, requiring reusability, and the low amount of sorbent that leads to high LOQs in some cases. Hence, stir-bar sorptive extraction (SBSE) [9] was proposed as an alternative with a higher amount of extracting phase. SBSE is commercially available with the name of Twister[®], and consists of a magnetic stirrer covered by the sorbent. The main advantage of SBSE respective to SPME was the increase of the amount of organic phase that can be translated into higher extraction efficiencies at the expense of increased time to reach the extraction equilibrium. Furthermore, until a few years ago, only polydimethylsiloxane (PDMS) coated SBSE devices were commercially available, limiting its applicability toward polar analytes, and again Twisters[®] needed to be reused. As an alternative approach, Popp et al. [10] proposed in 2004 the use of low cost disposable bulk silicone (PDMS), which allowed each device being discarded after each usage, and has been applied to a variety of analytes [11–14]. More recently, other bulk polymers, such as polyether-sulfone and polypropylene have been used to extend its applicability toward polar analytes [13,15–18]. Nonetheless, the use of bulk polymers cannot solve the long extraction equilibrium time often required in conventionally coated microextraction techniques including SBSE.

A judicious assessment of different sorbent-based sorptive microextraction techniques revealed that most of the drawbacks of these techniques stem from: (1) sorbent coating technique [19]; and (2) physical format of the microextraction device [20]. Although a number of coating techniques are available for sorbent immobilization on the substrate surface,

dip coating still dominates, in particular, in commercial SPME and SBSE device coating. Dip coating entails immersing the substrate into a solution of organic polymers followed by free radical cross-linking process [21]. The lack of chemical anchorage between the polymeric sorbent and the substrate is implicated to poor thermal, solvent, and chemical stability of these sorbents and limits the application of these microextraction techniques to a great extent. The high viscosity of these pseudo-liquid types of sorbents, e.g., PDMS and polyethylene glycol (PEG), in SPME and SBSE does not allow fast diffusion of the analytes into the sorbent mass, resulting in a long extraction equilibrium time. The physical format of the extraction devices (short fused silica fiber for SPME, and cylindrical glass tube for SBSE) also limits the sorbent loading capacity without increasing the coating thickness, and eventually instigates poor sensitivity of the microextraction device.

Fabric phase sorptive extraction (FPSE), developed by Kabir and Furton [22], has creatively addressed both the major shortcomings of microextraction techniques simultaneously. FPSE utilizes sol-gel coating technology [19,23] as the sorbent immobilization technique and inherently permeable fabric as the substrate, resulting in a microextraction device with high volume of intrinsically porous sorbent chemically bonded to the substrate. The high volume of sorbent containing easily accessible interaction sites, chemical bonding between the sorbent and substrate, preserved permeability of the fabric substrate and the hybrid nature of the composite sorbent material offers very high sample capacity, near-exhaustive extraction under the equilibrium extraction conditions, allows exposing to any organic solvent for elution/back-extraction, permits exposure to harsh chemical environment (pH 1–12) without substantial loss in extraction performance. Furthermore, FPSE opened up the possibility of exploiting hydrophobicity/hydrophilicity of the fabric substrates in order to fine tune the ultimate polarity/selectivity of the FPSE media, if required. The first application of FPSE combined to liquid chromatography for the determination of estrogens in water has already been presented [24], while some other applications are under development.

Herein, we aim to evaluate the applicability of FPSE for the determination of emerging pollutants in environmental water samples. The analytes selected were four non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), namely: ibuprofen (IBU), naproxen (NAP), ketoprofen (KET) and diclofenac (DIC). NSAIDs were chosen due to the environmental concern of these drugs [25,26] among which the four analytes selected are the most relevant. This environmental awareness has already reached regulatory and other governmental bodies. For instance, DIC has been included in the watch-list of last revision of the European Union Water Frame Directive (EU-WFD) [27], and NSAIDs have already been included into the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) official method 1694 [28], together with other emerging pollutants. Besides, several microextraction methods for the determination of NSAIDs have already been published in the literature, including several sorbent-based microextraction techniques, such as SPME [29–32] or SBSE [33]. Hence, this application field constitutes a good benchmark for FPSE. Therefore, the FPSE method was developed and combined with GC–mass spectrometry (GC–MS) after derivatization, validated, compared to existing literature and applied to the analysis of real samples.

2. Experimental

2.1. Material and chemicals

Substrates cotton fabric (100% cellulose) and polyester fabric (100% polyester) were purchased from Jo-Ann Fabric (Miami, FL, USA). Poly(tetrahydrofuran) (PTHF), acetone, dichloromethane, methyltrimethoxysilane (MTMS), and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Poly(dimethyldiphenylsiloxane) (PDMDPS) was purchased from Gelest (Morrisville, PA, USA). PEG (Carbowax 20M) was purchased from Sigma–Aldrich. Sodium hydroxide and hydrochloric acid were purchased from Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA). An Eppendorf Microcentrifuge Model 5415R (Eppendorf North America Inc., Hauppauge, NY, USA) was used to centrifuge different sol solutions in order to obtain particle free sol solutions. A Fisher Scientific Digital Vortex Mixture (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) was employed for thorough mixing of different solutions. Bubble-free sol solutions were obtained using a 2510 BRANSON Ultrasonic Cleaner (Branson Ultrasonics, Danbury, USA). A Barnstead Nanopure Diamond (Model D11911) deionized water unit (Dubuque, IA, USA) was used to obtain ultra-pure deionized water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) for sol–gel synthesis and substrate treatment in the USA lab, while in Spain it was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

IBU, DIC, KET and NAP were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) as solids of high purity (>98%). *N*-methyl-*N*-tert-butyl dimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) used as derivatization reagent (ampoules of 1 mL) was also from Aldrich. Individual stock solutions of each compound were prepared in methanol in a concentration of ca. 1000 mg L^{-1} . Mixed stocks solutions of 20 mg L^{-1} were prepared in methanol and ethyl acetate, and diluted as necessary for water fortification (methanol) or derivatization (ethyl acetate) and GC–MS analysis. LC-grade methanol and ethyl acetate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride (NaCl) was purchased from VWR Prolabo (Llinars del Vallès, Spain).

2.2. Preparation of FPSE media

2.2.1. Pretreatment of fabric substrates

50 cm^2 segments of cotton (100% cellulose) and polyester (100% polyester) fabrics were cut from commercial lots. The fabric pieces were first soaked with deionized water for 15 min under constant sonication. The fabrics were then cleaned with copious amount of deionized water to remove all physically adsorbed finishing chemicals residues, followed by treating with 1 M NaOH solution for 1 h under sonication. The mercerized fabrics were then washed several times with deionized water, followed by treating with 0.1 M HCl solution for 1 h under sonication. The treated fabrics were then washed with abundant deionized water and finally dried overnight in an inert atmosphere under continuous helium gas flow. The dried fabrics were stored in clean airtight glass containers until they are coated with sorbents.

2.2.2. Preparation of the sol solutions for coating the substrates

The sol solution for creating the sol–gel PTHF coating was prepared by using facile sol solution formulation developed in our lab [34]. Briefly, the sol solution was prepared by sequentially adding PTHF, MTMS, methylene chloride, acetone, trifluoroacetic acid, water in a mole fraction 0.04: 0.07: 0.16: 0.14: 0.04: 0.01, respectively. The mixture was thoroughly vortexed after adding a new ingredient into the sol solution to ensure that a homogenous solution is formed before adding the next ingredient. Then, it was further vortexed for 3 min, centrifuged for 5 min and finally the clear supernatant portion of the sol solution was transferred to a

clean 60 mL amber colored glass bottle. The sol solution for creating sol–gel PDMDPS and sol–gel PEG coatings were prepared in the same way but instead of PTHF, PDMDPS or PEG polymers were added, respectively.

2.2.3. Creation of sol–gel PTHF, sol–gel PDMDPS, and sol–gel PEG coatings on the substrate

Polyester fabric was used as the substrate for sol–gel PDMDPS, whereas cellulose fabric was used as the substrate for sol–gel PTHF and sol–gel PEG coatings. The clean and treated fabrics were gently inserted into the bottle containing the sol solution so that a three-dimensional network of sol–gel PDMDPS/or PTHF/or PEG can be formed throughout the porous substrate matrix. The fabrics were kept inside the sol solution for a pre-determined period of time. Upon completion of the coating period, the sol solution was expelled from the bottle and the coated fabric was dried and aged in a home-made conditioning device built inside a gas chromatography oven with continuous helium gas flow at 50°C for 24 h. Before using for FPSE, the sol–gel PDMDPS/or PTHF/or PEG coated fabric were rinsed sequentially with methylene chloride and methanol followed by drying at 50°C under an inert atmosphere for 1 h. The FPSE media coated with sol–gel PDMDPS/or PTHF/or PEG were then cut into $2.5 \text{ cm} \times 2.0 \text{ cm}$ and stored in a closed glass container to prevent from any contamination and used in this work. To determine the batch-to-batch coating reproducibility, 4 individual batches were prepared for each type of sorbent chemistries under identical coating conditions and the sorbent loading was calculated gravimetrically for the above mentioned dimensions (10 cm^2 , since both sides are coated). PDMDPS had an average loading of 9.7 mg per device (batch-to-batch RSD: 8.7%), PTHF of 19.8 mg per device (RSD: 5.5%) and PEG of 43.1 mg per device (RSD: 7.2%).

All FPSE extraction media were cleaned by immersing them in ethyl acetate for 15 min and then dried over a lint-free-tissue before each use. Once the extraction was completed and the media was desorbed, the same procedure of clean-up was performed and the FPSE media was stored to the next usage. All FPSE media were reused for over 30 times (over 50 times in the case of PEG, as being the finally selected sorbent material).

2.3. Collection of samples

Grab samples were obtained from the influent and effluent of an urban wastewater treatment plant (WWTP) equipped with a primary and secondary (activated sludge) treatment, and located in the northwest of Spain, which receives the discharges of ca. 130,000 inhabitants. River water samples were collected in two rivers, one of them (Sar River) about 5 km downstream after receiving the discharges of a municipal WWTP and the other one (Sarela River), corresponding to a relatively small and clean river.

All water samples were collected in 250 mL amber glass bottles, previously washed with methanol and ultrapure water and rinsed with the sample. They were filled up completely and analyzed as soon as they arrived at the laboratory. Before analysis, samples were filtered with $0.45 \mu\text{m}$ nitrocellulose filters (Millipore, Milford, MA, USA) to remove particulate matter and adjusted to pH 2 with concentrated HCl.

2.4. Extraction and derivatization

Under the optimized conditions, 30 mL of water sample (previously filtered) adjusted at pH 2 were disposed in a 60 mL glass screw-cap vial and a PTFE-magnetic bar. A sol–gel PEG coated FPSE media was immersed into the sample with help of a tweezers and the vial was capped and stirred for 2 h at 500 rpm. After that

Table 1
Selected physico-chemical properties of the analytes and GC–MS retention times and m/z values.

	Empirical formula	CAS no.	pK_a^a	$\log K_{ow}^a$	Ret. time (min) ^b	Quantifier ions (m/z) ^b	Qualifier ions (m/z) ^b
IBU	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	15687-27-1	4.41	3.5	14.24	263	161, 117
NAP	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	22204-53-1	4.84	2.8	22.42	287	185, 170
KET	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	22071-15-4	4.23	2.9	24.64	295	267, 311
DIC	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ₂	15307-86-5	4.18	4.5	26.23	352	354, 179

^a Data compiled from www.scifinder.cas.org, calculated with the ACD/Labs Software v11.02.

^b Referring to the corresponding derivatized compound (*tert*-butyldimethylsilyl-derivatives).

time, the FPSE media was removed from the water sample, cleaned with ultrapure water and dried with a lint-free-soft-tissue. For the desorption of the compounds, the FPSE media was introduced into a 2 mL screw-cap vial containing 1 mL of ethyl acetate for 15 min. Subsequently, the FPSE media was removed from the vial and the extract was evaporated to dryness by a gentle nitrogen stream. Then, the residue was reconstituted in a 100 μ L insert with 40 μ L of ethyl acetate and 10 μ L of MTBSTFA. The derivatization reaction took place in an oven at 60 °C for 60 min [35]. After cooling to room temperature, the extract was ready for GC–MS analysis.

2.5. Gas chromatography–mass spectrometry

The instrument used in this work was an Agilent 7890A gas chromatograph combined with an Agilent 7683B automatic sampler and an Agilent 5975C quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) working in electronic impact at 70 eV. The instrument was equipped with a capillary column (HP 5 MSI, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness, J & W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium (99.9999% Praxair, Spain) was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.2 mL min^{−1}. The volume injected was set to 2 μ L, in the splitless mode of operation. The oven temperature program was as follows: 100 °C, kept for 2 min, then ramped to 130 °C at 25 °C min^{−1}, a second ramp to 250 °C at 5 °C min^{−1} and a finally a ramp at 30 °C min^{−1} to 280 °C, held for 10 min. The total runtime was 38.2 min and the solvent delay was established in 8.5 min. Transfer line, MS source and MS quad temperatures were set at 280 °C, 230 °C and 150 °C, respectively. The derivatized target compounds were measured in the selected ion monitoring mode, with each compound being monitored at different time windows defined by the corresponding retention times, with a dwell time of 100 ms for each ion. For each compound one quantifier and two qualifier ions were recorded, as detailed in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. FPSE optimization

3.1.1. FPSE sorbent, pH and ionic strength

Although many different FPSE coatings can be prepared, in this case only three were considered on the basis of their polarity: PDMDPS (a non-polar sorbent similar to PDMS), PTHF (of intermediate polarity) and PEG (polar coating). Hence, in order to select the best suited coating chemistry for the tested analytes, taking into consideration also the effect of pH and ionic strength and their possible interaction, a mixed-level factorial design (3¹ \times 2²) was used. With this design, the coating chemistry was studied at three levels and the other two variables at two levels, by performing 15 experiments (including 3 central points). The experimental domain (Table 2), in the case of the pH was 2–12 (pH units) and for the ionic strength between 0 and 30% NaCl (w/v). Experiments were performed with 15 mL of ultrapure water spiked with 5 ng mL^{−1} of compounds for 4 h at 500 rpm. The FPSE media

was desorbed in 0.5 mL of ethyl acetate for 15 min, derivatized and analyzed by GC–MS. Peak area was used as the response for statistical analysis with the aid of the Statgraphics Centurion 16.1 software (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA).

As presented in Table 2, the most important factor was the pH, which exhibited a statistically significant (95% significance level) negative effect, i.e., better extraction efficiency is obtained in acidified samples, in agreement with the acidic character of NSAIDs. Conversely, the ionic strength does not play a relevant role on FPSE, as the percentage of NaCl was far away from the statistical significance boundary. Finally, the extracting material was statistically significant for NAP and close to the significance Student-*t* significance boundary for remaining analytes. Moreover, the second order term (AA in Table 2) was also close to the statistical significance boundary for KET and NAP. This effect is visualized in the main effects plot (Fig. 1) where it can be observed that for KET and NAP a better response is obtained at the intermediate level, i.e., with the PEG fiber, while for IBU and DIC, the extraction efficiency with PEG and PTHF was very similar. It is also important to mention that interaction terms were not significant, as such, the sol-gel PEG coated FPSE media was found to be the best extraction media for these NSAIDs independently of the pH and ionic strength.

In view of those results, the pH was fixed at 2, samples were not modified with NaCl and the sol-gel PEG coated FPSE media was selected for further optimization experiments.

3.1.2. Sample volume

The different sample volumes considered were: 15, 30 and 70 mL ($n=3$) using the extraction conditions described in the previous section and by varying the sample volume. All samples were spiked at 5 ng mL^{−1} level. As presented in Fig. 2, when the sample volume is increased to 30 mL from 15 mL, the signal (peak area) is doubled. However, when this sample volume is further increased to 70 mL, the increase of the response is only a 20–35%, despite the 2.5-fold increment in the sample amount (respecting 30 mL). Therefore, sample volume was fixed in 30 mL.

Table 2

Experimental domain for the mixed-level 3¹ \times 2² design and standardized effects for the main factors and second order terms. Student-*t* significance boundary: $t=2.36$.

	Coating (A)	pH (B)	%NaCl (C)	Second order terms			
Low level	PDMDPS	2	0				
Central level	PEG	7	15				
High level	PTHF	12	30				
IBU	1.83	−4.83 ^a	−0.067	−0.84	−0.68	−0.64	0.29
NAP	2.43 ^a	−5.05 ^a	0.16	−1.87	−1.48	−0.33	−0.05
KET	2.30	−5.11 ^a	0.52	−2.25	−1.60	0.009	−0.42
DIC	2.17	−5.77 ^a	0.81	−0.79	−0.68	−0.23	0.16

^a Indicates a (95% confidence) statistically significant term.

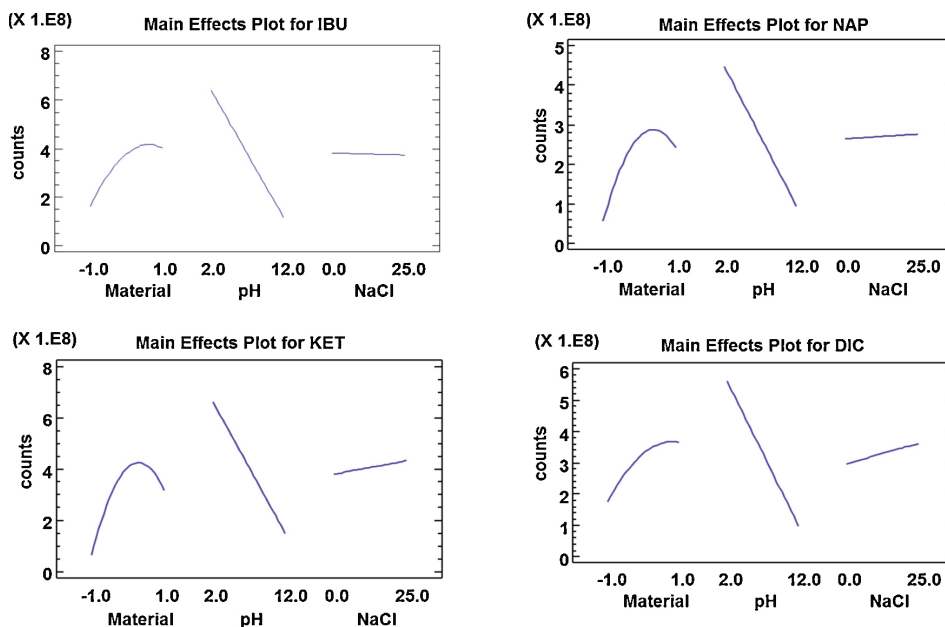


Fig. 1. Main effects plots obtained during the experimental design optimization of coating, pH and NaCl.

3.1.3. Extraction kinetics

Extraction kinetics were studied in 1 min to 4 h range, with 30 mL of ultrapure water samples adjusted at pH 2, spiked with 1 ng mL^{-1} ($n=3$) and using a sol-gel PEG coated FPSE media as extracting material. Desorption was performed as in previous experiments. The results obtained (peak areas) were fitted with the software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) to the equation proposed by Chen and Pawliszyn [36] for SPME, slightly modified as described in [37,38]. Hence, the time to reach the equilibrium (t_{95}) is defined as the time needed to reach 95% of the maximum theoretically obtainable area, at $t=\infty$ (A_{max}). So t_{95} can be calculated as $2.996/a$, where a is the kinetic constant [37,38].

The results are compiled in Fig. 3, where it can be observed that the equilibrium is reached in 45 to 100 min, depending on the analyte. The regression determination coefficients (R^2) from the kinetic plot fittings were quite good (>0.93), bearing in mind that the home made FPSE media was manually cut and the variability inherent to the extraction. Moreover, this equilibrium time is shorter than that obtained by SBSE [33] and SPME [29] from similar amounts of sample.

Finally, the extraction time for the target analytes was set to 2 h, in order to work under equilibrium conditions and to decrease the variability. This extraction time could be decreased to 45 min maintaining good extraction efficiency (Fig. 3) if necessary, but since many parallel extractions can be performed with a multi-point stirrer plate (15 positions in our case), it was decided to work in the equilibrium for all analytes.

3.1.4. Desorption time

The final step in method optimization was the study involving desorption of analytes from the FPSE media, which are solvent nature and volume and time required for desorption. In this case, only ethyl acetate was considered because of its good compatibility with the derivatization reaction [35] and already known good performance for desorption of NSAIDs

from SPE and microextraction media (such as SBSE) [33,35]. Desorption time was also fixed at 15 min, because no improvements were observed at longer times (data not shown).

Finally, regarding solvent volume, this was assessed with FPSE media, loaded with the analytes by extractions performed with samples of ultrapure water (30 mL, $n=4$) spiked at 5 ng mL^{-1} in the previously optimized conditions. After that, the extracting media were cleaned with ultrapure water, dried and consecutively desorbed four times with 0.5 mL fresh ethyl acetate aliquots, each for 15 min. Then, each extract was derivatized and injected separately. As shown in Fig. 4, around 80% of the compounds were desorbed with the first 0.5 mL. With the second desorption an overall of 95% of compounds were transferred to the solvent and the amount of analytes remaining on the FPSE material was lower than 5%, and very low traces were detected in the final fourth desorption step.

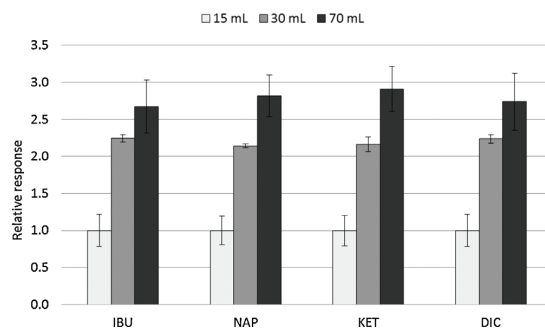


Fig. 2. Effect of the sample volume on NSAIDs extraction. Results are relative to the response for the lowest volume tested (15 mL, $n=3$).

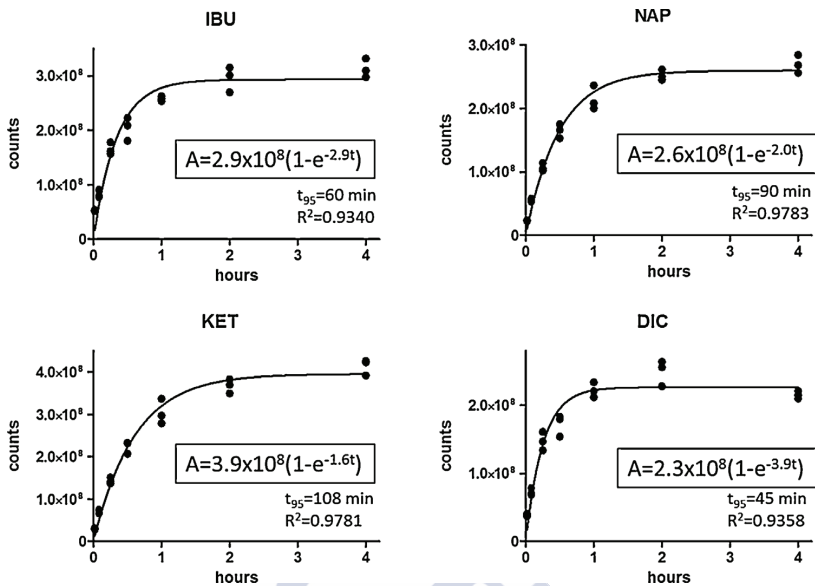


Fig. 3. Kinetics of the FPSE of NSAIDs. Data fitted according the equation described in references [36–38].

Hence, desorption was performed with 1 mL of ethyl acetate for 15 min, as it was observed that the recoveries were the same that using two consecutive fractions of 0.5 mL (data not shown). FPSE media were then cleaned with further ethyl acetate, if reused.

3.2. Method performance

3.2.1. Extraction efficiency and enrichment factor

To evaluate the extraction efficiency (EE), various aliquots of ultrapure water samples spiked with 200 ng L⁻¹ of the analytes were submitted to FPSE optimized protocol. Then these samples were analyzed and their area compared to that of standards prepared in ethyl acetate and derivatized, taking into account the expected concentration if the EE would be 100% (120 μg L⁻¹) [39]. The results of EE ranged from 27% to 70%, for DIC and IBU respectively (Table 3). These EE is quite high for an equilibrium extraction technique, as for instance are similar to those obtained by SBSE [33], but with a much shorter equilibration time (see Table 4).

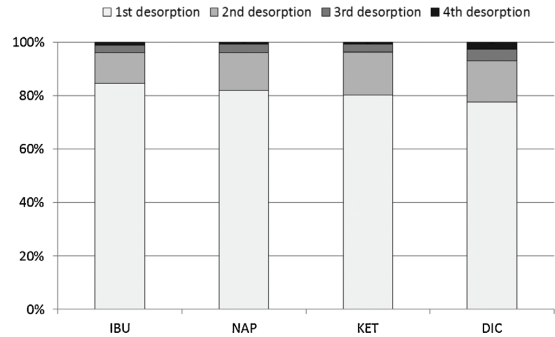


Fig. 4. Relative desorption of NSAIDs obtained from four consecutive 0.5 mL desorption of the same FPSE media with ethyl acetate (n=4).

Besides the EE, the enrichment factor (EF) was also calculated by multiplying the EE by the maximum theoretical enrichment (600-fold, based on volumes of the sample and final extract) and divided by 100. As shown in Table 3, the EF obtained ranges from 162 to 418.

3.2.2. Linearity and precision

The linearity of the method was assessed by spiking ultrapure water samples with increasing amounts of NSAIDs from the LOQ to 20 μg L⁻¹ with a total of 10–12 calibration levels (depending on the

Table 3 Performance of the FPSE followed by derivatization and GC–MS developed method.

	IBU	NAP	KET	DIC
LOD (ng L ⁻¹) ^a	0.8	2	5	2
LOQ (ng L ⁻¹) ^b	3	5	15	7
R ² _c	0.9990	0.9986	0.9991	0.9990
Enrichment factor (EF)	418	263	223	162
% Extraction efficiency (EE)	70	44	37	27
Trueness (% relative recoveries) ^d				
Surface water ^e	109	108	107	101
Surface water ^f	107	111	108	96
Effluent water ^f	92	93	92	94
Influent water ^f	82	97	97	116
Precision (%RSD)				
Milli-Q (20 ng L ⁻¹) ^g	3.5	7.2	11	18
Milli-Q (200 ng L ⁻¹) ^g	6.0	9.0	16	10
Surface water ^e	8.5	13	9.3	15
Surface water ^f	8.1	11	13	14
Effluent wastewater ^f	3.9	9.0	7.3	13
Influent wastewater ^f	17	18	14	11

^a S/N = 3.
^b S/N = 10.
^c Calibration levels: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng L⁻¹; 1, 2, 5, 10 and 20 μg L⁻¹. Each calibration level was measured twice. Only those levels above LOQ were employed.
^d Relative recoveries from calibrations in ultrapure water.
^e Samples spiked at the 0.2 μg L⁻¹ level (n=4).
^f Samples spiked at the 10 μg L⁻¹ level (n=4).
^g n = 6.

Table 4

Comparison of the developed FPSE method with other selected sorptive extractive publications. Only those methods considering the four NSAIDs, MS detection and derivatization are shown here. Data given corresponds only to the four NSAIDs, despite other analytes could have been measured.

Extraction ^a	Determination	Sample volume (mL)	Extraction time (min)	Equilibrium time (min)	%EE	LOQ (ng L ⁻¹)	Precision (%RSD)	Calibration method ^b	Trueness (% relative recovery)	Reference
SPME	GC–MS	22	40	>120	–	15–40	4–9	SA	–	[29]
SBSE	GC–MS	15	240	240	26–107	43–70	3–20	ISC	77–107	[33]
MEPS	GC–MS	5	6	0.75 mL ^c	–	11–360	3–13	ISC	60–160	[40]
FPSE	GC–MS	30	120	45–100	27–70	3–15	4–18	ESC	82–116	This work

^a MEPS: microextraction by packed sorbents.

^b SA: standard addition; ISC: internal standard calibration; ESC: external standard calibration.

^c In MEPS no equilibrium time is defined, but the maximum amount of water sample that can be percolated, in a way similar to the breakthrough volume in SPE.

analyte) each being performed in duplicate. As presented in Table 3, the linearity was excellent, considering the broad range tested (LOQ–20 µg L⁻¹), with determination coefficients (R^2) higher than 0.998.

The precision was evaluated with 20 and 200 ng L⁻¹ ultrapure water spiked samples and real river and wastewater at the 0.2–10 µg L⁻¹ concentration. RSD values were below 20% for all NSAIDs, with the highest value (18%) corresponding to DIC at the lowest spiked level in ultrapure water and for NAP in the dirtiest water. These results are deemed acceptable (Table 4) keeping in mind that no internal standard is used in order to simplify the method, as compared to the literature [33,40].

3.2.3. Matrix effects and trueness with complex water matrices

The application of equilibrium microextraction analytical techniques to complex matrix (e.g., sewage) can be translated into a lower EE as compared with ultrapure water, since the presence of organic dissolved matter can compete with sorbent for the analytes, altering the distribution coefficient and decreasing the extraction efficiency or slowing down extraction kinetics [41,42]. Such matrix effects may render biased results if it is not properly accounted for and lead to increased limits of detection (LODs) and LOQs.

In order to evaluate matrix effects and the trueness of the method with external calibrations performed with ultrapure water extracted by the FPSE protocol, surface water and influent and effluent wastewater were considered. Thus, samples were spiked with 0.2–10 µg L⁻¹ of the analytes ($n=4$) and their concentration calculated from ultrapure water calibrations. Unspiked samples were also measured and their concentrations subtracted for relative recoveries calculation. As presented in Table 3, apparent

recoveries were in the 96–111%, 92–94% and 82–116% range for surface water, effluent and influent wastewater, respectively. Therefore, matrix effects can be considered negligible in most cases, even with complex samples, with the highest bias found for NAP in the most complex sample (–18%). This trueness values are quite satisfactory and could be improved by using deuterated surrogates if necessary, while avoiding time-consuming standard addition protocols necessary in other cases, such as SPME [29].

3.2.4. Limits of detection and quantification

Since the concentration of the NSAIDs in the real samples was quite high (see Section 3.3), LODs and LOQs were calculated from ultrapure water spiked samples at a low concentration level (5 to 20 ng L⁻¹, depending on the analyte). LODs were established for a signal-to-noise (S/N) equal to 3, whereas a value of 10 was used for the LOQ. Since no significant matrix effects occur with the developed method, the obtained values should not differ too much from those obtainable with real samples. As compared to other sorbent-based sorptive microextraction techniques (Table 4), LOQs are better than those obtained by SPME [29], SBSE [33] and even microextraction with packed sorbents (MEPS) [40].

3.3. Application to real samples

The developed FPSE, derivatization and GC–MS analytical method was finally applied to the analysis of two influent and effluent samples from a WWTP and to two river water samples, one of them after the discharge of the WWTP and the second one, from a relatively clean small river. As an example, a chromatogram of a wastewater sample is presented in Fig. 5.

As shown in Table 5, the concentrations in the influent ranged from ca. 100 ng L⁻¹ (DIC) up to 10–15 µg L⁻¹ (IBU). In the effluent, after wastewater treatment, the concentration of IBU was considerably lower (ca. 25–100 ng L⁻¹), while KET and DIC seem to be more recalcitrant (ca. 90–450 ng L⁻¹). These spot samples represent the already known pattern of consumption of NSAIDs and their elimination at conventional WWTPs [25,26,43]. However, the concentrations of IBU in the influent has increased in the last decade, as it were detected in the 2–6 µg L⁻¹ in the period 2000–2002 in the same WWTP [35,44]. Actually, a survey conducted by Rodil et al. in nearby WWTPs in Galicia (Spain) in

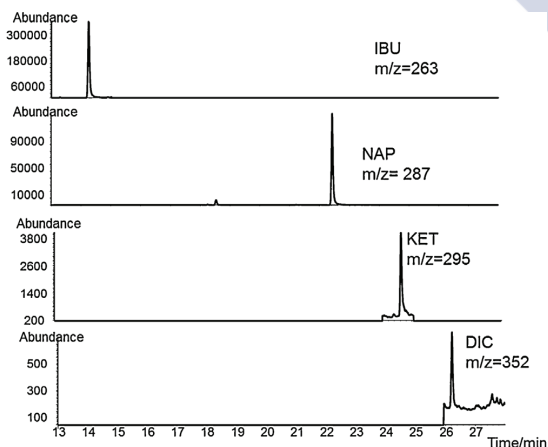


Fig. 5. Chromatogram of a real influent wastewater sample (code 2 in Table 5).

Table 5

Concentration of the target compounds in the samples analyzed ($n=3$). Data expressed as mean \pm standard deviation in µg L⁻¹.

	IBU	NAP	KET	DIC
Influent 1	9 \pm 1	5.0 \pm 0.2	0.70 \pm 0.08	0.11 \pm 0.01
Influent 2	15 \pm 2	6.2 \pm 0.2	0.85 \pm 0.07	0.09 \pm 0.01
Effluent 1	0.09 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.45 \pm 0.05
Effluent 2	0.026 \pm 0.003	0.047 \pm 0.006	0.38 \pm 0.06	0.09 \pm 0.02
River 1	0.13 \pm 0.04	0.11 \pm 0.04	0.06 \pm 0.02	0.15 \pm 0.03
River 2	0.06 \pm 0.01	0.026 \pm 0.002	0.045 \pm 0.001	<LOQ

the period 2007–2008 reported a median value of $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for IBU [43].

In the river receiving the effluent of the WWTP (Sar River), the concentrations were at the $50\text{--}150 \text{ ng L}^{-1}$ range, whereas in the “clean” Sarela river DIC below the LOQ, but the remaining NSAIDs could still be detected at the $25\text{--}55 \text{ ng L}^{-1}$ concentration level (Table 5).

4. Conclusions

In this work, three different FPSE sorbent chemistries, sol–gel PDMDPS, sol–gel PTHF, and sol–gel PEG were investigated for the rapid and efficient analysis of four important NSAIDs in environmental water samples. FPSE provided a fast microextraction method for NSAIDs, robust (without matrix effects), broad linear range and adequate LODs/LOQs.

Compared to other sorbent-based sorptive microextraction techniques, FPSE possessed many unique advantages including simplicity in device fabrication; low cost; high EE; faster extraction equilibrium; and field deployability; among others.

Acknowledgements

This research was funded by Xunta de Galicia (project no. EM2012/055 and “Consolidación” funds) the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (*Ministerio de Economía y Competitividad*) and FEDER funds through: project no. CTQ2010-18927, CTQ2012-33080 and FPI grant (awarded to Inés Racamonde). We are also grateful to Viaqua for providing access to wastewater samples.

References

- [1] D. Fatta, A. Achilleos, A. Nikolaou, S. Meriç, Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 515–533.
- [2] P. Vázquez-Roig, C. Blasco, Y. Picó, Advances in the analysis of legal and illegal drugs in the aquatic environment, *Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 65–77.
- [3] T. Kosjek, E. Heath, A. Krbavčić, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples, *Environ. Int.* 31 (2005) 679–685.
- [4] V. Koutsouba, T. Heberer, B. Fuhrmann, K. Schmidt-Baumler, D. Tsipl, A. Hiskia, Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography–mass spectrometry, *Chemosphere* 51 (2003) 69–75.
- [5] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 31–39.
- [6] R. Hu, Z. Yang, L. Zhang, Trace analysis of acidic pharmaceutical residues in waters with isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry via methylation derivatization, *Talanta* 85 (2011) 1751–1759.
- [7] J.B. Quintana, M. Ramil, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela, New sample-preparation strategies for analytical determinations, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2014, pp. 1–98.
- [8] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [9] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE): a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [10] P. Popp, C. Bauer, A. Paschke, L. Montero, Application of a polysiloxane-based extraction method combined with column liquid chromatography to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 307–312.
- [11] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, Suitability of polydimethylsiloxane rods for the headspace sorptive extraction of polybrominated diphenyl ethers from water samples, *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 41–47.
- [12] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollaín, R. Cela, Alternative sorptive extraction method for gas chromatography determination of halogenated anisoles in water and wine samples, *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 84–91.
- [13] C. Valls-Cantenys, E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, M. Iglesias, V. Salvadó, R. Cela, Application of polydimethylsiloxane rod extraction to the determination of sixteen halogenated flame retardants in water samples, *Anal. Chim. Acta* 770 (2013) 85–93.
- [14] N. Negreira, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, Silicone discs as disposable enrichment probes for gas chromatography–mass spectrometry determination of UV filters in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 603–611.
- [15] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2642–2666.
- [16] E. Villaverde-de-Sáa, I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Ion-pair sorptive extraction of perfluorinated compounds from water with low-cost polymeric materials: polyethersulfone vs polydimethylsiloxane, *Anal. Chim. Acta* 740 (2012) 50–57.
- [17] I. Carpinteiro, B. Abián, M. Rodríguez, R. Cela, Sorptive extraction with in-sample acetylation for gas chromatography–mass spectrometry determination of ethylphenol species in wine samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7208–7214.
- [18] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, M. Ramil, R. Cela, Suitability of polypropylene microporous membranes for liquid- and solid-phase extraction of halogenated anisoles from water samples, *J. Chromatogr. A* 1198–1199 (2008) 21–26.
- [19] S.L. Chong, D. Wang, J.D. Hayes, B.W. Wilhite, A. Malik, Sol–gel coating technology for the preparation of solid-phase microextraction fibers of enhanced thermal stability, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3889–3898.
- [20] I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1002–1010.
- [21] *Handbook of Solid Phase Microextraction*, in: J. Pawliszyn (Ed.), Elsevier, 2011.
- [22] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (FPSE), US Patent Application: 14/216121, March 17, 2014.
- [23] A. Kabir, K.G. Furton, A. Malik, Innovations in sol–gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 197–218.
- [24] R. Kumar, G. Heena, A.K. Malik, A. Kabir, K.G. Furton, Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography–fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1359 (2014) 16–25.
- [25] S. Mompelat, A. Jaffrezic, E. Jardé, B. Le Bot, Storage of natural water samples and preservation techniques for pharmaceutical quantification, *Talanta* 109 (2013) 31–45.
- [26] *Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle*, in: M. Petrovic, D. Barceló (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [27] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, *Off. J. Eur. Lex* L226, 24/08/2013.
- [28] Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, December 2007 Method 1694. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2007.
- [29] I. Rodríguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 1–8.
- [30] M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry of biologically active substances in water samples, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 95–106.
- [31] N. Huppert, M. Wuertele, H.H. Hahn, Determination of the plasticizer *N*-butylbenzenesulfonamide and the pharmaceutical ibuprofen in wastewater using solid phase microextraction (SPME), *Fresenius' J. Anal. Chem.* 362 (1998) 529–536.
- [32] L. Araujo, J. Wild, N. Villa, N. Camargo, D. Cubillán, A. Prieto, Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta* 75 (2008) 111–115.
- [33] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction–liquid desorption–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27–39.
- [34] A. Kabir, C. Hamlet, A. Malik, Parts per quadrillion level ultra-trace determination of polar and nonpolar compounds via solvent-free capillary microextraction on surface-bonded sol–gel polytetrahydrofuran coating and gas chromatography–flame ionization detection, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 1–13.
- [35] I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography–mass spectrometry as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 265–274.
- [36] Y. Chen, J. Pawliszyn, Kinetics and the on-site application of standards in a solid-phase microextraction fiber, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5807–5815.
- [37] I. Racamonde, E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1245 (2012) 167–174.
- [38] I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, In-sample derivatization–solid-phase microextraction of amphetamines and ecstasy related stimulants from water and urine, *Anal. Chim. Acta* 770 (2013) 75–84.
- [39] Z. Es'haghi, Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by in situ derivatization, continuous hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography–flame ionization detector, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 83–88.
- [40] G. Grueiro-Noche, M.E. Fernández-Laespada, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, S. Muniategui-Lorenzo, Microextraction by packed sorbent for the analysis of pharmaceutical residues in environmental water samples by in situ derivatization–programmed temperature vaporizer–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9390–9396.

- [41] J.B. Quintana, R. Rodil, T. Reemtsma, Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 19–26.
- [42] J.B. Quintana, I. Rodríguez, Strategies for the microextraction of polar organic contaminants in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1447–1461.
- [43] R. Rodil, J.B. Quintana, E. Concha-Graña, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain), *Chemosphere* 86 (2012) 1040–1049.
- [44] M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, M. Llompart, C. García-Jares, I. Rodríguez, M. Gómez, T. Ternes, Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Res.* 38 (2004) 2918–2926.







IV. CONCLUSIONES GENERALES

GENERAL CONCLUSIONS



En este capítulo se pretenden presentar unas conclusiones generales derivadas del trabajo que se ha realizado en esta Tesis. Las conclusiones detalladas para cada uno de los artículos publicados se recogen en el capítulo anterior.

A lo largo de esta Tesis se han desarrollado y validado diferentes técnicas de extracción basadas en la ab/adsorción sobre ab/adsorbentes sólidos. Algunas de estas técnicas son ampliamente conocidas como la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción en fase sólida (SPE) mientras que otras poseen un menor número de aplicaciones como la extracción con polímeros comerciales de bajo coste o la todavía más reciente extracción con polímeros modificados químicamente (FPSE). Además, se ha demostrado la contaminación de las aguas residuales y superficiales de la zona con compuestos químicos de origen antropogénico, en particular con aquellos relacionados con el consumo de drogas de abuso y fármacos.

- La SPME ha demostrado ser una tecnología libre de disolventes y con una excelente sensibilidad y robustez para la extracción de derivados del cannabis y de estimulantes de tipo anfetamínico (ATS) en muestras acuosas.

- Se ha abordado la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) como técnica de determinación para las drogas de abuso (derivados del cannabis y ATS), debido a su menor coste y mayor simplicidad en comparación con los sistemas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), que se emplean habitualmente en la bibliografía, obteniendo excelentes resultados.

- Se ha profundizado en los diferentes modos de derivatización que se pueden llevar a cabo cuando se emplea la SPME. Por una parte, se ha evaluado la habilidad de dos reactivos sililantes para llevar a cabo una derivatización *on fiber* de los cannabinoides. Mientras que en el caso de los ATS se ha abordado una derivatización *in situ* empleando isobutilcloroformiato que forma derivados estables en agua.

- Se ha comprobado la posibilidad de transferir la metodología desarrollada para ATS en muestras acuosas a muestras biológicas (orina) con unos excelentes resultados en cuanto a linealidad, sensibilidad y robustez.

- Con la metodología desarrollada se ha confirmado la presencia de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) en el agua residual, pese a ser uno de los analitos a los que menos atención se le ha prestado en el estudio de drogas de abuso en la bibliografía. Además, se ha detectado la contaminación de las aguas superficiales que reciben las descargas de las estaciones depuradoras de aguas residuales (WWTPs) con la presencia de trazas de drogas de abuso.

- Se ha comprobado la idoneidad de los cartuchos poliméricos de modo mixto para retener de forma efectiva (mediante SPE) analitos polares con constantes de acidez muy diferentes pertenecientes a la familia de las benzodiazepinas (BZPs) y compuestos relacionados. También se estudió la dependencia de los efectos de matriz con el factor de concentración de los extractos al emplear LC-MS/MS como técnica de determinación.

- Por otra parte, el polipropileno ha demostrado ser un excelente material de extracción para la misma familia de fármacos permitiendo desarrollar métodos multianalito con la sensibilidad necesaria para su determinación medioambiental. De nuevo, el empleo de disolventes ha sido mínimo y la robustez de la técnica ha sido demostrada en diferentes matrices acuosas. A pesar de necesitar tiempos de extracción largos, su simplicidad permite realizar múltiples extracciones simultáneamente y con un coste muy bajo, aunque para la extracción de compuestos muy ácidos es preferible el empleo de SPE.

- Se han estudiado diferentes tratamientos para el almacenamiento de las muestras, observando que las condiciones ácidas tradicionalmente aplicadas para minimizar la actividad biológica no eran las más adecuadas para estabilizar los metabolitos con grupos 7-amino de las BZPs ya que conducían a su desaparición.

-Con el desarrollo de estas dos metodologías analíticas se ha confirmado por primera vez en España, la presencia en aguas residuales de diferentes BZPs y algunos de sus metabolitos humanos (p.ej temazepam y ácido ritalínico). Los datos obtenidos ofrecen una panorámica actual sobre la presencia de un amplio número de ansiolíticos e hipnótico-sedantes en aguas residuales y superficiales en España. Además, a partir de estos datos se podría extender potencialmente la metodología de estudios epidemiológicos a partir de las aguas residuales. Con ello, se podría estimar el consumo

de estos fármacos, susceptibles de un uso abusivo/ilícito, de manera similar a como ya se ha realizado para las drogas de abuso.

- Se ha confirmado que la disposición estructural de la fase extractante en la FPSE permite un rápido acceso de los analitos, lo que se traduce en tiempos de extracción mucho menores que con otros dispositivos. Además, la mayor cantidad de fase permite obtener límites de cuantificación más bajos que con la mayoría de métodos basados en el equilibrio para la determinación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). El empleo de FPSE ha permitido obtener una metodología con muy poco consumo de disolvente orgánico y libre de efectos de matriz. Como consecuencia, se ha desarrollado una metodología muy rápida y sencilla para la determinación de NSAIDs en muestras acuosas.

- El análisis de muestras de agua residual (influyente y efluente) y agua superficial revela concentraciones de NSAIDs claramente superiores a las de otros fármacos estudiados en esta Tesis, con valores alrededor de 2 o 3 órdenes de magnitud mayores. En relación con estudios previos en la misma zona se pudo observar un incremento en la presencia de ibuprofeno, mientras que para el resto de NSAIDs se observaron concentraciones similares. Además se confirma la baja degradación del diclofenaco con los tratamientos que se llevan a cabo en la WWTP con lo que se puede concluir una presencia de NSAIDs en el medio acuoso cada vez más recalcitrante.



This chapter summarizes the main conclusions from this Thesis. Detailed conclusions for each of the published articles are presented in the previous chapter.

Different extraction techniques based on sorptive extraction on polymeric sorbents were optimized and validated during this Thesis. Some of them are well-established techniques, as solid-phase microextraction (SPME) and solid-phase extraction (SPE) and others have received less attention, as it is the case of low cost commercial polymers or fabric phase sorptive extraction (FPSE). Also, it has been demonstrated that sewage and surface water are clearly polluted with antropogenic compounds, particularly by those related to the consumption of drugs of abuse and pharmaceuticals.

- SPME has proved to be a solvent free technology with excellent sensitivity and robustness for the extraction of cannabinoid derivatives and amphetamine-type stimulants (ATS) in aqueous samples.

- Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was the technique selected to carry out the determination of drugs of abuse due to its low cost and simplicity as compared to liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) systems, traditionally employed in the literature for these analytes, and was proven to provide good results.

- Different derivatization reagents in combination with SPME were evaluated: silylating reagents to carry out the *on fiber* derivatization of cannabinoids and chloroformates for the *in situ* derivatization of ATS.

- The possibility to transfer the methodology developed for the determination of ATS in aqueous samples to a biological matrix (urine) has also been tested. Excellent results in terms of lineality, sensitivity and trueness were obtained.

- The presence of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) in wastewater has been confirmed, despite being one of the analytes to which less attention has been paid in the literature. The pollution of surface waters receiving discharges from wastewater treatment plants (WWTPs) has also been confirmed, since traces of drugs of abuse were also detected.

- The potential of polymeric mixed-mode cartridges to effectively retain polar compounds with very different acid/base properties belonging to the family of benzodiazepines (BZPs) and related chemicals by SPE has been demonstrated. Also, the relationship between matrix effects in the LC-MS/MS and the concentration factor was studied in depth.

- As an alternative to SPE, polypropylene has demonstrated to be an excellent material for the microextraction of BZPs and related chemicals, with the necessary sensitivity for environmental applications. Again, as with SPME, the use of solvents was minimal and the robustness of the technique has been demonstrated in several aqueous matrices. Despite requiring long extraction times, its simplicity allows multiple extractions being performed simultaneously at very low cost, although SPE is preferred for the extraction of the most acidic analytes.

- The study of sample storage showed that the acidic conditions traditionally applied to minimize biological activity were not the most suitable to stabilize metabolites of BZPs containing 7-amino functionalities.

- With the development and validation of these two methodologies, for first time in Spain, different BZPs and human metabolites have been detected in wastewater (e.g. temazepam or ritalinic acid). The data obtained provided an overview of the presence of a large number of anxiolytic and hypnotic-sedative compounds in sewage and surface waters in Spain. Furthermore, these data could be potentially used to estimate the consumption of these drugs, susceptible to abuse/misuse, using the “wastewater-based epidemiology” approach that has already been described for drugs of abuse.

- The structural arrangement of the extractant phase in FPSE allowed a quick access of analytes to the extractant, with equilibrium times much lower than those obtained with other techniques. Furthermore, as it incorporates a higher amount of sorbent, the limits of quantification obtained are lower than those obtained with most equilibrium-based methods for non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). As a consequence, a very simple and rapid analytical methodology for the determination of NSAIDs in aqueous samples was proposed with low solvent consumption and free of matrix effects.

- The concentrations of NSAIDs detected in (raw and treated) wastewater are clearly higher than those of the other drugs studied in this Thesis, with values around 1 to 3 orders of magnitude higher. In contrast to previous studies in the same area, it was observed an increase in the presence of ibuprofen, while other NSAIDs concentrations were similar. Moreover, the low removal of diclofenac by the treatments performed in the WWTPs was confirmed. So, the presence of NSAIDs in the aqueous medium seems to be still an issue.







V. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS



A		
ACN	Acetonitrile	Acetonitrilo
AcOEt	Ethyl acetate	Acetato de etilo
AEMPS	Spanish Pharmaceuticals and Health Products Agency	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ADHD	Attention deficit/hyperactivity disorder	Trastorno por déficit de atención con hiperactividad
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization	Ionización química a presión atmosférica
APPI	Atmospheric-pressure photoionization	Fotoinización a presión atmosférica
ATC	Anatomical, therapeutical and chemical classification system	Sistema de clasificación anatómica, terapéutica y química
ATS	Amphetamine-type stimulants	Estimulantes de tipo anfetamínico
B		
BCF	Butylchloroformate	Butilcloroformiato
BSA	N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide	N,O-bis(trimetilsilil)acetamida
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BZPs	Benzodiazepines	Benzodiazepinas
C		
CAR/PDMS	Carboxen/polydimethylsiloxane	Carboxen/polidimetilsiloxano
CF	Correction factor	Factor de corrección
CID	Collision-induced dissociation	Disociación inducida por colisión
CW	Carbowax	Carbowax
CW/TPR	Carbowax/templated resine	Carbowax/resina templada
D		
DAWN	Drug Abuse Warning Network	Red Norteamericana de Alerta sobre Abuso de Drogas
DDD	Daily-defined dose	Dosis diarias definidas
DI-SPME	Direct-mode solid-phase microextraction	Microextracción en fase sólida en modo inmersión o directo
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMS	Dimethyl sulfate	Sulfato de dimetilo
DSPE	Dispersive solid-phase extraction	Extracción en fase sólida en modo dispersivo
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane	Divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano
E		
EC ₅₀	Half maximal effective concentration	Concentración media de efecto observado
ECD	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-etilcarbodiimide chloride	Cloruro de N-(3-dimethylaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EtCF	Ethylchloroformate	Etilcloroformiato
ECF	Effective concentration factor	Factor de concentración efectivo
ECOSAR	Ecological Structure Activity Relationships	Relación entre la Estructura y la Actividad Ecológica
EDADES	Spanish survey on alcohol and drug consumption	Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en la población general en España
EE	Extraction efficiency	Eficacia de extracción

EI	Electron impact	Impacto electrónico
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction	Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías
EPA	Environmental Protection Agency of the United States	Agencia Estadounidense de Protección del Medioambiente
ESI	Electrospray source ionization	Ionización por electrospray
F		
FDA	United States Food and Drug Administration	Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FPSE	Fabric phase sorptive extraction	Extracción con polímeros modificados químicamente
G		
GABA	Gamma-aminobutyric acid	Ácido gamma-aminobutírico
GCB	Graphitized carbon black	Carbón grafitizado
GC	Gas chromatography	Cromatografía de gases
H		
HCF	Hexylchloroformate	Cloroformiato de hexilo
HFBA	Heptafluorobutyric acid	Ácido heptafluorobutírico
HFBCI	Heptafluorobutyric acid chloride	Cloruro de ácido heptafluorobutírico
HF-LPME	Hollow-fiber liquid-phase microextracción	Microextracción en fase líquida con fibra hueca
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance	Balance hidrofílico-lipofílico
HMDS	Hexamethyldisilazane	Hexametildisilazano
HPLC/LC	High performance liquid chromatography	Cromatografía líquida de alta resolución
HS-SPME	Head-space solid-phase microextraction	Microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza
I		
iBCF	Isobutylchloroformate	Cloroformiato de isobutilo
IDL	Instrumental detection limit	Límite de detección instrumental
INCB	International Narcotics Control Board	Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes
IQL	Instrumental quantification limit	Límite de cuantificación instrumental
ISO	International Organization for Standardization	Organización Internacional de Normalización
IT	Ion trap	Trampa de iones
K		
K _{ow}	Octanol-water partition coefficient	Coeficiente de partición octanol-agua
L		
LC	Liquid chromatography	Cromatografía líquida
LC ₅₀	Half maximal lethal concentration	Concentración letal media
LIT	Linear-ion trap	Trampa de iones lineal
LLE	Liquid-liquid extraction	Extracción líquido-líquido
LOD	Limit of detection	Límite de detección
LOEC	Lowest observed effect concentration	Concentración más baja a la que se observa un efecto

LOQ	Limit of quantification	Límite de cuantificación
LVI	Large-volume injection	Inyección de grandes volúmenes
M		
MASE	Membrane-assisted solvent extraction	Extracción con disolventes asistida con membranas
MAX	Mixed-mode anionic exchange	Intercambiador aniónico de modo mixto
MBTFA	N-methyl-bis(trifluoroacetamide)	N-metil-bis(trifluoroacetamida)
MCX	Mixed-mode cationic exchange	Intercambiador catiónico de modo mixto
ME	Matrix effects	Efectos de matriz
MeOH	Methanol	Metanol
MEPs	Microextraction in a packed syringe	Microextracción en jeringas empaquetadas
MIPs	Molecular imprinted polymers	Adsorbentes de impronta molecular
MISPE	Molecular imprinted solid-phase extraction	Extracción en fase sólida empleando polímeros de impronta molecular
MRM	Multiple reaction monitoring	Monitorización de iones múltiples
MS	Mass spectrometer/Mass spectrometry	Espectrómetro de masas/Espectrometría de masas
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Espectrometría de masas en tándem
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide	N-(<i>tert</i> -butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida
MW	Molecular weight	Peso molecular
N		
NIST	National Institute of Standards and Technology	Instituto Nacional para la Estandarización y la Tecnología
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs	Antiinflamatorios no esteroideos
O		
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
P		
PA	Polyacrilate	Poliacrilato
PCF	Propylchloroformate	Propilcloroformiato
PDMDPS	Polydimethyldiphenylsiloxane	Polidimetildifenilsiloxano
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxane/divinylbenzene	Polidimetilsiloxano/divinilbenceno
PEG	Polyethyleneglycol	Polietilenglicol
PES	Polyethersulphone	Polietersulfona
PFBBr	Pentafluorobenzyl bromide	Bromuro de pentafluorobenzilo
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Politetrafluoroetileno
PGC	Porous graphitic carbon	Carbón negro poroso
PP	Polypropylene	Polipropileno
PS-DVB	Polystyrene-divinylbenzene	Poliestireno-divinilbenceno

PTHF	Polytetrahydrofuran	Politetrahidrofurano
P _{vapor}	Vapour pressure	Presión de vapor
Q		
Q	Quadrupole analyzer	Analizador de cuadrupolo o cuadrupolar
QqQ	Triple quadrupole analyzer	Analizador de triple cuadrupolo
R		
RAM	Restricted access materials	Adsorbentes de acceso restringido
REITOX	European Information Network on Drugs and Drug Addiction	Red Europea de Información sobre Drogas y Adicciones
RSD	Relative standard deviation	Desviación estándar relativa
S		
SBSE	Stir-bar sorptive extraction	Extracción mediante absorción sobre barras agitadoras
SDME	Single-drop microextraction	Microextracción con gota
SIM	Selected ion monitoring	Monitorización del ión seleccionado
SIS	Selected ion storage	Almacenamiento del ión seleccionado
S/N	Signal-to-noise ratio	Relación señal-ruido
SPE	Solid-phase extraction	Extracción en fase sólida
SPME	Solid-phase microextraction	Microextracción en fase sólida
T		
TBA	Tetrabutylammonium	Tetrabutilamonio
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TBDMSC	<i>tert</i> -butyldimethylchlorosilane	<i>tert</i> -butildimetilclorosilano
TCF	Theoretical concentration factor	Factor de concentración teórico
TDU	Termodesorption unit	Sistema de termodesorción
TEA	Triethylamine	Trietilamina
TEST	Toxicity Estimation Software Tool	Software para la Estimación de la Toxicidad
TFA	Trifluoroacetic acid	Ácido trifluoroacético
TFAA	Trifluoroacetic anhydride	Anhídrido trifluoroacético
TFEA	Trifluoroethylamine hydrochloride	Hidrocloreuro de trifluoroetilamina
TMS	Trimethylsilyl	Trimetilsililo
TMSC	Trimethylchlorosilane	Trimetilclorosilano
TMSH	Trimethylsulfonium hydroxide	Hidróxido de trimetilsulfonio
TOF	Time of flight analyzer	Analizador de tiempo de vuelo
U		
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime	Oficina para las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
U(H)PLC	Ultra (high)performance liquid chromatography	Cromatografía líquida ultra rápida
US	Ultrasounds energy	Energía de ultrasonidos

US-LLE	Ultrasound liquid-liquid extraction	Extracción líquido-líquido asistida por ultrasonidos
V		
VP-DVB	N-vinilpirrolidona-divinilbenceno	N-vinilpirrolidone-divinilbenzene
W		
WAX	Weak-anionic exchange	Intercambiador aniónico débil
WCX	Weak-cationic exchange	Intercambiador catiónico débil
WHO	World Health Organization	Organizacion Mundial de la Salud
WWTPs	Wastewater treatment plants	Plantas de tratamiento de agua residual







VI. ANEXOS



Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in Europe quantified by wastewater analysis

Christoph Ort^{1*}, Alexander L. N. van Nuijs^{2*}, Jean-Daniel Berset³, Lubertus Bijlsma⁴, Sara Castiglioni⁵, Adrian Covaci², Pim de Voogt^{6,7}, Erik Emke⁶, Despo Fatta-Kassinos⁸, Paul Griffiths⁹, Félix Hernández⁴, Iria González-Mariño¹⁰, Roman Grabic¹¹, Barbara Kasprzyk-Hordern¹², Nicola Mastroianni¹³, Axel Meierjohann¹⁴, Thomas Nefau¹⁵, Marcus Östman¹⁶, Yolanda Pico¹⁷, Ines Racamonde¹⁰, Malcolm Reid¹⁸, Jaroslav Slobodnik¹⁹, Senka Terzić²⁰, Nikolaos Thomaidis²¹ & Kevin V. Thomas¹⁸

Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag), Dübendorf, Switzerland,¹ Toxicological Center, University of Antwerp, Antwerp, Belgium,² Water and Soil Protection Laboratory, Bern, Switzerland,³ Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón de la Plana, Spain,⁴ Department of Environmental Health Sciences, IRCCS—Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milan, Italy,⁵ KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, the Netherlands,⁶ Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands,⁷ NIREAS-International Water Research Center, University of Cyprus, Nicosia, Cyprus,⁸ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon, Portugal,⁹ IIAA—Institute of Food Analysis and Research, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain,¹⁰ University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Vodnany, Czech Republic,¹¹ Department of Chemistry, University of Bath, Bath, UK,¹² Water and Soil Quality Research Group, Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Barcelona, Spain,¹³ Laboratory of Organic Chemistry, Åbo Akademi University, Åbo, Finland,¹⁴ Laboratoire Santé Publique Environnement, University of Paris Sud, Châtenay-Malabry, France,¹⁵ Department of Chemistry, Umeå University, Umeå, Sweden,¹⁶ Food and Environmental Safety Research Group, University of Valencia, Valencia, Spain,¹⁷ Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo, Norway,¹⁸ Environmental Institute, Kos, Slovak Republic,¹⁹ Division for Marine and Environmental Research, Rudjer Boskovic Institute Bijenicka, Zagreb, Croatia²⁰ and Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece²¹

*Co-first authors.

ABSTRACT

Aims To perform wastewater analyses to assess spatial differences and temporal changes of illicit drug use in a large European population. **Design** Analyses of raw wastewater over a 1-week period in 2012 and 2013. **Setting and Participants** Catchment areas of wastewater treatment plants (WWTPs) across Europe, as follows: 2012: 25 WWTPs in 11 countries (23 cities, total population 11.50 million); 2013: 47 WWTPs in 21 countries (42 cities, total population 24.74 million). **Measurements** Excretion products of five illicit drugs (cocaine, amphetamine, ecstasy, methamphetamine, cannabis) were quantified in wastewater samples using methods based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Findings** Spatial differences were assessed and confirmed to vary greatly across European metropolitan areas. In general, results were in agreement with traditional surveillance data, where available. While temporal changes were substantial in individual cities and years (P ranging from insignificant to $<10^{-3}$), overall means were relatively stable. The overall mean of methamphetamine was an exception (apparent decline in 2012), as it was influenced mainly by four cities. **Conclusions** Wastewater analysis performed across Europe provides complementary evidence on illicit drug consumption and generally concurs with traditional surveillance data. Wastewater analysis can measure total illicit drug use more quickly and regularly than is the current norm for national surveys, and creates estimates where such data does not exist.

Keywords Amphetamine, cannabis, cocaine, drugs of abuse, ecstasy, methamphetamine, sewage.

Correspondence to: Christoph Ort, Urban Water Management, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Überlandstrasse 133, CH-8600 Dübendorf, Switzerland. E-mail: christoph.ort@eawag.ch; Alexander van Nuijs, Toxicological Center, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium. E-mail: alexander.vannuijs@uantwerpen.be

Submitted 24 July 2013; initial review completed 9 October 2013; final version accepted 1 April 2014

INTRODUCTION

Illicit drug use is a covert and hidden activity that presents methodological challenges for drug surveillance

systems. Questionnaire-based survey methods have traditionally been an important component of the approaches employed to monitor drug use, but it is recognized that these methods are not sufficient to monitor

trends in drug use adequately and quickly, and require complementary data from other sources [1,2]. The analysis of the excretion products of illicit drugs in wastewater [wastewater analysis (WWA)] has been explored since 2008 as an additional approach for estimating illicit drug use within specified regions, i.e. the catchment areas of wastewater treatment plants (WWTP) [3,4]. While the approach cannot provide information on the behaviour of single users and on their demographics, there are a number of ways in which WWA can complement other survey methods and provide additional information to understand the illicit drug situation more clearly. Wastewater data can be obtained within short time-frames, are not prone to response biases and can help in identifying the spectrum of illicit drugs being used by a population. This is potentially important, given the emergence of new psychoactive substances [5]. Drug users are often unaware of the actual substance or mix of substances they are consuming, which makes self-report data unreliable. Wastewater analysis is therefore a potential approach to detect and estimate the use of new psychoactive substances; however, it should be noted that more information is necessary regarding their biotransformation pathways.

Wastewater analysis can provide information on daily, weekly, monthly and annual variations in illicit drug use. The weekly profile of cocaine and amphetamine-like stimulants use has already been assessed by collecting consecutive daily wastewater samples, which revealed higher use of these substances during weekends [6–12]. The monitoring of temporal trends in illicit drug consumption over a longer period of time (months) by WWA has been evaluated in three studies, and the major conclusions were that there was typically an increase of illicit drug use during holiday periods [11,13,14]. Wastewater analysis was further applied to detect yearly trends in illicit drug consumption in Italy and Australia [15,16]. In conclusion, this approach can provide important and timely information on short- and long-term trends in illicit drug use.

Wastewater studies in different countries have also detected regional variations in illicit drug use [17–22]. The influence of urbanization on the use of illicit drugs was evaluated in Oregon (USA) and South Australia and Queensland (Australia), concluding that the use of illicit drugs was higher in urban regions compared to more rural areas [9,14,23]. Wastewater analysis has also been applied to detect transnational differences in illicit drug use. The consumption of five substances was evaluated by analysing wastewater from 19 European cities for a 1-week period in 2011 [24]. Wastewater analysis can thus complement survey methods for a clearer understanding of actual spatial differences and temporal changes in illicit drug use.

However, until now no international study has been performed covering multiple countries over multiple years with a common protocol and adequate quality control measures. Therefore, the aims of this study were to:

- 1 collect wastewater samples from multiple European locations in 2012 and 2013;
- 2 calculate population-normalized mass loads of benzoylecgonine [BE; as indicator for cocaine (COC) use], amphetamine (AMP), methamphetamine (METH), ecstasy [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)] and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol [THC-COOH; as indicator for tetrahydrocannabinol (THC) use]; and
- 3 perform analytical quality control through inter-laboratory tests.

METHODS

Sewer system characterization

Relevant information for each WWTP catchment was gathered systematically by means of a standardized questionnaire. An extended version of the questionnaire developed for earlier studies [24,25] was used (Supporting information, Appendix S1). It comprises more than 50 questions classified according to importance. The number of the most important questions per category is indicated in brackets (year 2012/year 2013): General information (1/1), Catchment and population (2/5), Sewer system (2/2), WWTP influent (1/1), Sampling (5/5), Flow meter (3/3), Sample handling (9/9), Monitoring period (5/5).

Sampling and analysis

A 1-week period was targeted in 2012 (17–23 April) and 2013 (6–12 March). Daily 24-hour composite raw wastewater samples were collected over 7 consecutive days. Considering stability, metabolism and unambiguous indication of drugs actually having been consumed, the most suitable target residues were targeted: BE, AMP, METH, MDMA and THC-COOH [4]. It should be noted that the consumption of COC and THC was monitored through the analysis of their main metabolite because of higher concentrations and higher stability in wastewater.

Samples were spiked with isotope-labelled internal standards, either filtered and extracted immediately on solid-phase extraction cartridges or frozen at –20 °C until analysis. Each laboratory used fully validated analytical methods: target compounds present in the liquid phase of the wastewater were quantified in final extracts or with direct injection applying liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry or high-resolution mass spectrometry [25].

For quality assurance, each laboratory participated in yearly inter-laboratory tests (de Voogt *et al.*, unpublished). External quality control samples were evaluated (one standard in methanol and two fortified raw wastewater samples). A reliable estimation of the method limit of quantification (LOQ) was performed by evaluating the signal-to-noise ratio in these samples. In 2012, one of 14 laboratories did not meet the requirements for any compound in the inter-laboratory test and was excluded. In 2013, only METH results of one of 15 laboratories had to be excluded.

Calculations

Daily mass loads (g/day) of drug residues entering the WWTPs were calculated by multiplying measured concentrations (ng/L) in daily samples with the corresponding wastewater volumes (L/day). To compare cities of different sizes, mass loads are normalized by the population size of the catchment (mg/1000 people/day). The estimated consumption of COC (section Benzoylcegonine) was back-calculated from the population-normalized mass loads of BE using a correction factor of 3.59 that takes the urinary excretion rate of COC into account for different dosages and routes of administration [25].

Uncertainty assessment

Mainly four components of uncertainty may affect the estimation of population-normalized drug loads: sampling (U_s), chemical analysis (U_c), flow rate measurement (U_f) and population estimation (U_p). Because the focus of this study is on mass loads in wastewater, uncertainties related to excretion rates and biodegradation in sewers are not considered. When estimating the overall uncertainty U_T of a mean value over an n -day monitoring period, uncertainty components that are random and independent on every day will be reduced by \sqrt{n} . This applies to U_s , as each sample is collected physically independent of the day before. All other components cannot be reduced by \sqrt{n} : (i) population is only estimated once, (ii) chemical analysis is carried out for all samples in one batch, and (iii) if a flow meter measures flows systematically incorrectly, it will be in the same direction every day. All components can be considered as independent. As long as U_s , U_c and $U_f \leq 30\%$ and $U_p \leq 10\%$ [relative standard deviation (RSD)], an estimation of U_T is valid with an approximative formula (e.g. [26]). A Monte Carlo simulation was used to avoid underestimating U_T systematically because a conservative estimate of U_p in our study is 20% (see Supporting information, Appendix S2).

RESULTS

Table 1 lists participating cities: in 2012, 25 WWTPs in 11 countries were included (23 cities, total population

11.50 million); in 2013, there were 47 WWTPs in 21 countries (42 cities, total population 24.74 million). For comparison, 2011 data [24] were also used (21 WWTPs in 11 countries; 19 cities, total population 14.12 million). Figures 1–5 summarize all results. Countries are ordered based on average loads over all years. The numbers in brackets indicate cities' overall ranks. While absolute variability within 1-week periods (grey range) is obviously higher for high loads, relative variability is not substantially different throughout the entire load range and may vary from year to year, even within a location. The colour of the lines between the means indicate whether the change from 1 week in 1 year to 1 week in another year is significant (Wilcoxon, $\alpha = 0.05$). Table 2 summarizes overall means, separately for cities that participated in all 3 years (cities in bold type in Figs 1–5) and for all cities per year (excluding cities that exhibited explainable anomalies, i.e. cities in italic type in Figs 1–5). Concentration values that were $<LOQ$ were treated as follows: (1) if all values at a location for a certain compound were $<LOQ$, loads were set to zero; (2) if at least one value was $>LOQ$, values $<LOQ$ were replaced with $0.5 \times LOQ$. Dashed grey lines indicate a population-weighted overall mean for 2013 (all cities except cities in italics). When weekly patterns were evaluated in 2012, previous findings were confirmed, i.e. higher loads on weekends for BE, and MDMA and no substantial variation for AMP, METH and THC-COOH [24] (see Supporting information, Appendix S4).

Benzoylcegonine

The highest weekly mean BE loads in the period 2011–13 were observed in wastewater from Amsterdam, Antwerp, London and Zurich and were between 400–850 mg/1000 people/day (Fig. 1). Loads were also relatively high (between 200–550 mg/1000 people/day) in Barcelona, Basel, Geneva, Utrecht and Eindhoven. The lowest values (<100 mg/1000 people/day) were observed in locations from northern, eastern and southern Europe. These results suggest a clear geographical difference in COC consumption, with higher use in western Europe. This is further demonstrated when BE loads in locations from Germany are evaluated. Loads in Dresden (eastern Germany) are negligible, similar to the amounts seen in the Czech Republic, while loads in Dortmund (western Germany) are comparable to the loads observed in the Belgian, Dutch and Swiss cities.

The overall population-weighted mean loads of BE for the 16 locations included in all 3 years were almost identical (Table 2). This suggests a stable use of COC in the investigated locations in the period 2011–13. Location-specific results from 2011, 2012 and 2013 are generally in agreement (Fig. 1); however, in some cases, variations

Table 1 Summary of participating cities and wastewater treatment plants (WWTP). More detailed information can be found in Supporting information (Appendix S3), which includes raw data and answers from the questionnaire.

Estimated population in WWTP catchment															Targeted 1-week monitoring period ✓ (n = 7 days)				
Country	City	WWTP	Population of the city under investigation ⑥	①			①			①			Loss of wastewater ②	Com-muters ③	Special events ④				
				2011	method (year)	2012	method (year)	2013	method (year)	2011	2012	2013							
BBA	Sarajevo	Butile	C: 291 422; M: 515 012 (W)						130 000	b (2013)		✓	◇	R (2013)					
BEE	Antwerp D.	Deurne	498 473 (E 2011)			213 876	a (2011)	213 876	a (2012)		✓	✓	◇						
	Antwerp Z.	Zuid	498 473 (E 2011)	117 200	a (2010)	130 218	a (2011)	130 218	a (2012)	✓	✓	✓	◇						
	Brussels	Noord	1136 778 (E 2011)	1 027 300	b (2011)	953 987	b (2012)	953 987	b (2013)	✓	✓	✓	◇						
	Geraardsbergen	Geraardsbergen	32 629 (W)					29 047	c (2011)			March 8–13	◇						
	Koksijde	Wulpen	31 207 (W)					78 441	a (2012)			March 21–27	◇						
CH	Ninove	Ninove	37 295 (W)					36 179	c (2013)			✓	◇						
	ProRheno	ProRheno	C: 195 743 (L 2013)			260 000	c (2012)	260 000	c (2012)		✓	✓	◇	R (2012)					
	Region Bern	Region Bern	C: 137 818 (L 2012)			206 655	c (2012)	206 700	c (2012)		April 21–27	✓	◇	R (2012)					
	Geneva	SIG	C: 194 458 (L 2013)			410 486	c (2012)	410 500	c (2012)		April 22–28	✓	◇	R (2012)					
	St Gallen	Au and Hofen	C: 74 070 (L 2013)			89 000	c (2012)	89 000	c (2012)		✓ (n = 5)	✓	◇	R (2012)					
(2 WWTPs)																			
CY	Zurich	Werdböhlzi	C: 394 012 (L 2012)			410 000	c (2012)	410 000	c (2012)		✓	✓	◇	Y (2012)					
	Nicosia	Pano Delfera	234 200 (E 2009)					28 000	c (2012)			March 21–27	◇	Y (2013)					
CZ	Limassol	Amathus	185 100 (E2009)					272 000	c (2010)			March 21–27	◇	Y (2013)					
	Budweis	COV	93 620 (E 2011)	112 000	d (2010)	112 000	d (2010)	110 300	d (2013)	✓	✓	✓	◇	Y (2011)					
DE	Prague	UCOV	1241 664 (E 2011)			1 300 000	c (2011)	1 300 000	c (2011)		✓	✓	◇						
	Dortmund	Deusen	580 956 (E 2012)					371 788	c (2010)			March 13–19	◇						
	Dülmen	Dülmen	46 071 (W)					34 495	c (2010)			✓	◇						
DK	Dresden	Kaditz	529 781 (E 2012)					593 050	c (2012)			✓	◇						
	Copenhagen	Lynetten	501 285 (E 2003)					531 000	c (2009)			March 6–13 (n = 7)	◇						
ES	Barcelona	Baix Llobregat	C: 1 620 943; M: 3 202 571 (E 2012)	1 162 000	c (2007)	1 162 000	c (2010)	1 162 000	c (2010)	March 16–22	✓	✓	◇	Y (2012/13)					
	Castellon	Castellon de la Plana	C: 180 204 (E 2012)	170 600	a (2010)	204 878	b (2012)	204 878	b (2013)	✓	✓	February 20–26	◇	R (2013)					
Santiago	Silvouta	Silvouta	95 671 (E 2012)	136 500	d (2010)	136 500	d (2010)	136 500	d (2010)	✓ (n = 6)	✓	✓	◇						
	Pinedo I + II ^a	Pinedo I + II ^a	C: 797 028 (E 2012); M: 1 353 250 (L 2013)	1 839 000	a ^{oo} /b ^c (2011)			1 357 952	e ^{oo} (2011)/b ^c (2013)	✓		✓	◇	R (2011/13)					
	Valencia	and QB ^{oo}											◇						

Table 1 Cont.

Country	City	WWTP	Population of the city under investigation [®]	Estimated population in WWTP catchment			Targeted 1-week monitoring period [✓] (n = 7 days)				Loss of wastewater ^②	Com-muters ^③	Special events ^④
				2011	2012	2013	method (year)	2011 Mar 9–15	2012 Apr 17–23	2013 Mar 6–12			
FI	Helsinki	Vikimäki	M: 1 022 139 (E 2009)	780 000	a (2009)	780 000	a (2009)	✓	✓	✓	△	–	–
TU	Kakola	Kakola	178 630 (E 2012)	*275 000	d (2011)	275 000	d (2011)	✓ (n = 6)	✓	✓	△	–	R (2012)
FR	Paris	Seine Centre [†] / Grésillon ^{††}	C: 2 243 718 (E 2010), M: 6 507 783 (E 2006)	*774 600	b (2011)	**245 500	f (2012)	✓	✓	✓	●	◇	Y (2012)
GB	London	Beckton	8 174 000 (L 2011)	3 400 000	a (2010)	3 400 000	e (2010)	✓ (n = 6)	–	–	–	–	–
GR	Athens	Psytalia	M: 2 989 023 (E 2009)	650 000	c (2001)	650 000	c (2011)	✓	✓	✓	△	◇	–
HR	Zagreb	Central	C: 688 163; M: 1 107 623 (W)	650 000	c (2001)	650 000	c (2011)	✓	✓	✓	–	■	–
IT	Milan	Nosedo	1 295 705 (E 2009)	1 250 000	c (2010)	1 100 000	b (2012)	✓	✓	✓	△	◇	–
NL	Amsterdam	West	779 808 (E 2011)	694 800	b (2011)	769 000	c (2010)	✓	✓	✓	△	◇	Y (2012)
	Eindhoven	Eindhoven	216 036 (E 2011)	448 700	b (2011)	450 300	c (2005)	✓	✓	✓	–	◇	Y (2011/12)
	Utrecht	Utrecht	311 367 (E 2011)	297 000	b (2011)	300 000	c (2010)	✓ (n = 5)	✓	✓	●	–	Y (2011)
NO	Oslo	VEAS	599 230 (E 2011)	557 000	c (2009)	557 000	c (2009)	✓	✓	✓	△	◇	–
PT	Lisbon	Alcantara	C: 537 412; M: 1 860 256 (E 2012)	557 000	c (2009)	557 000	c (2012)	✓	✓	✓	●	■	–
RO	Cluj Napoca	Cluj Napoca	304 802 (E 2011)	350 000	c (2011)	350 000	c (2011)	✓	✓	✓	–	–	–
RS	Belgrade Sewer	Outlet Danube	C: 1 232 731; M: 1 659 440 (W)	284 347	c (2008)	284 347	c (2008)	–	March 17–23 (n = 6)	–	△	◇	–
	Novi Sad Sewer	Outlet Danube	M: 341 625 (W)	321 282	d (2013)	321 282	d (2013)	–	March 14–19 (n = 6)	–	–	–	R (2013)
SE	Gothenburg	Ryaverket	513 751 (E 2010)	664 441	c (2011)	664 441	c (2011)	✓	✓	✓	△	◇	–
	Stockholm	Henriksdals (only 1 of 2 inlets)	C: 847 073; M: 1 550 208 (E 2010)	315 000	c (2009)	664 441	c (2011)	✓	✓	✓	–	–	–
	Umeå	Öns	115 473 (E 2010)	115 800	c (2010)	115 800	c (2010)	✓	✓	✓	△	◇	–
SK	Bratislava	Central and Petržalka	415 589 (L 2012)	440 000	c (2011)	440 000	c (2011)	✓	✓	✓	●	■	Y (2013)
	Piestany	Piestany	29 660 (W)	30 000	c (2011)	30 000	c (2011)	✓	✓	✓	●	◇	Y (2013)

[®] Population of entire city/region. C: city; M: metropolitan, greater region. (E, W, L): Eurostat, Wikipedia and local bureau for population statistics (year). ^① Method for population estimation in WWTP catchment (year of estimate). a, Influent nutrient load over corresponding calendar year; b, influent nutrient load over actual sampling period; c, census; d, house connections/drinking water subscribers; e, values adopted from previous estimation; f, WWTP different from 2011/13 but wastewater from same catchment (central collection with subsequent distribution to different WWTPs). *Population estimate indicated in [24] was erroneous and population-normalized consumption estimates are corrected with updated value. ^② Loss of wastewater (exfiltration, questionnaire 2013). △, no loss expected; ●, loss indicated (unknown amount or <20%); ▲, loss >20% expected; –, information missing. ^③ Commuters (work days versus weekend, questionnaire 2013). ◇, No substantial net population increase/decrease due to commuters; ■, net increase of population on workdays; –, information missing. ^④ Special events during/adjacent to monitoring period. Y, please see Supporting information. Appendix S3 for type of event (year provided in brackets). R, rain before/during monitoring period (higher flows but no substantial effect on drug loads expected).

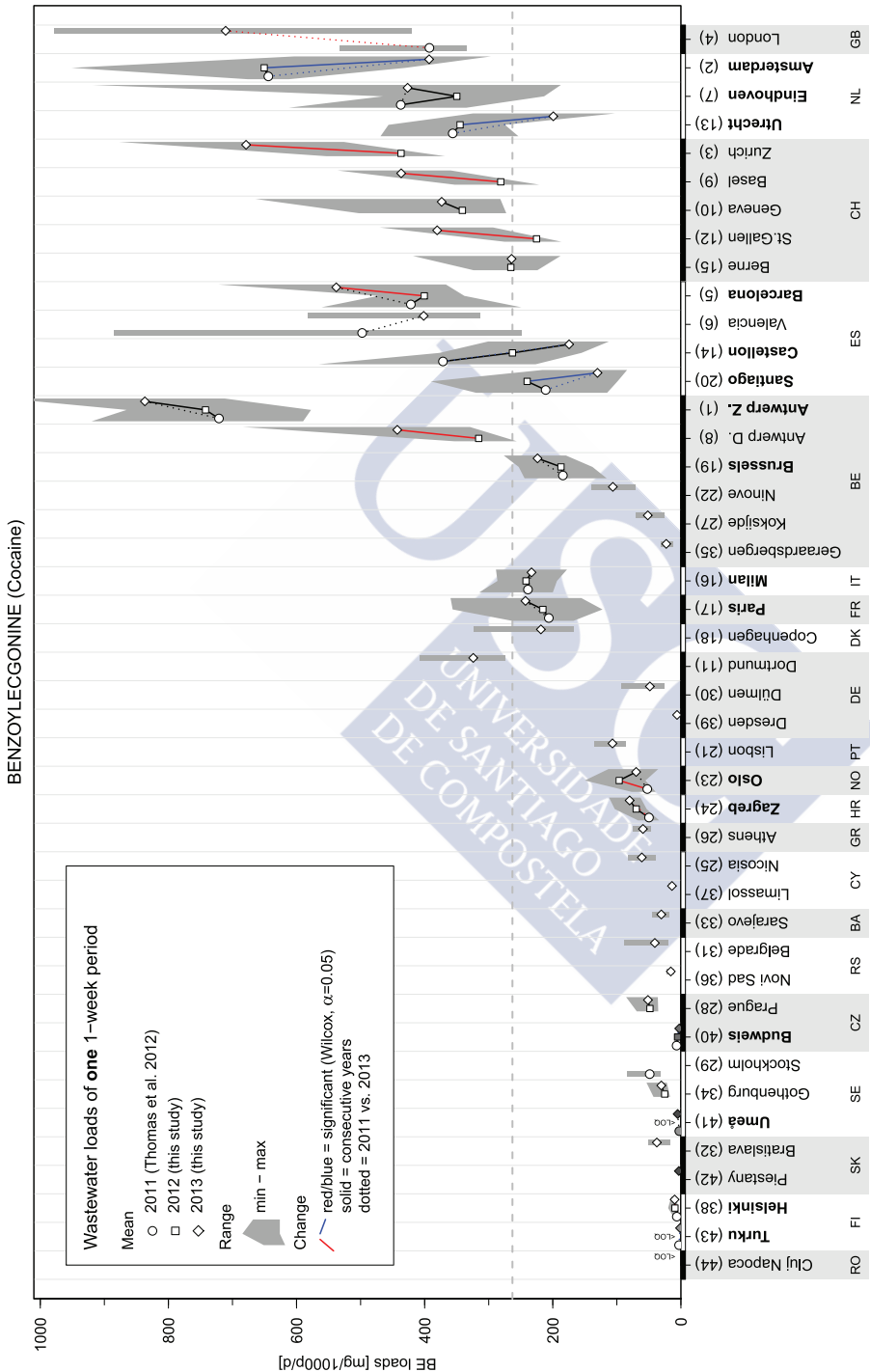


Figure 1 Population-normalized benzoylecgonine (BE) loads of a single 1-week period per year. See Table 1 for more information. <LOQ: concentrations in all daily samples were below limit of quantification (LOQ). Grey dashed line: 2013 overall mean of all participating cities. Dot colour: white: concentrations in all samples were below LOQ; grey shading: one or more concentrations were below LOQ and set to 0.5*LOQ (the darker the grey, the more concentrations were below LOQ). Numbers in brackets: cities' rank (average over all available years). Cities in bold type participated in all 3 years and were used to calculate annual overall means (see Table 2). All P-values can be found in Supporting information, Appendix S3

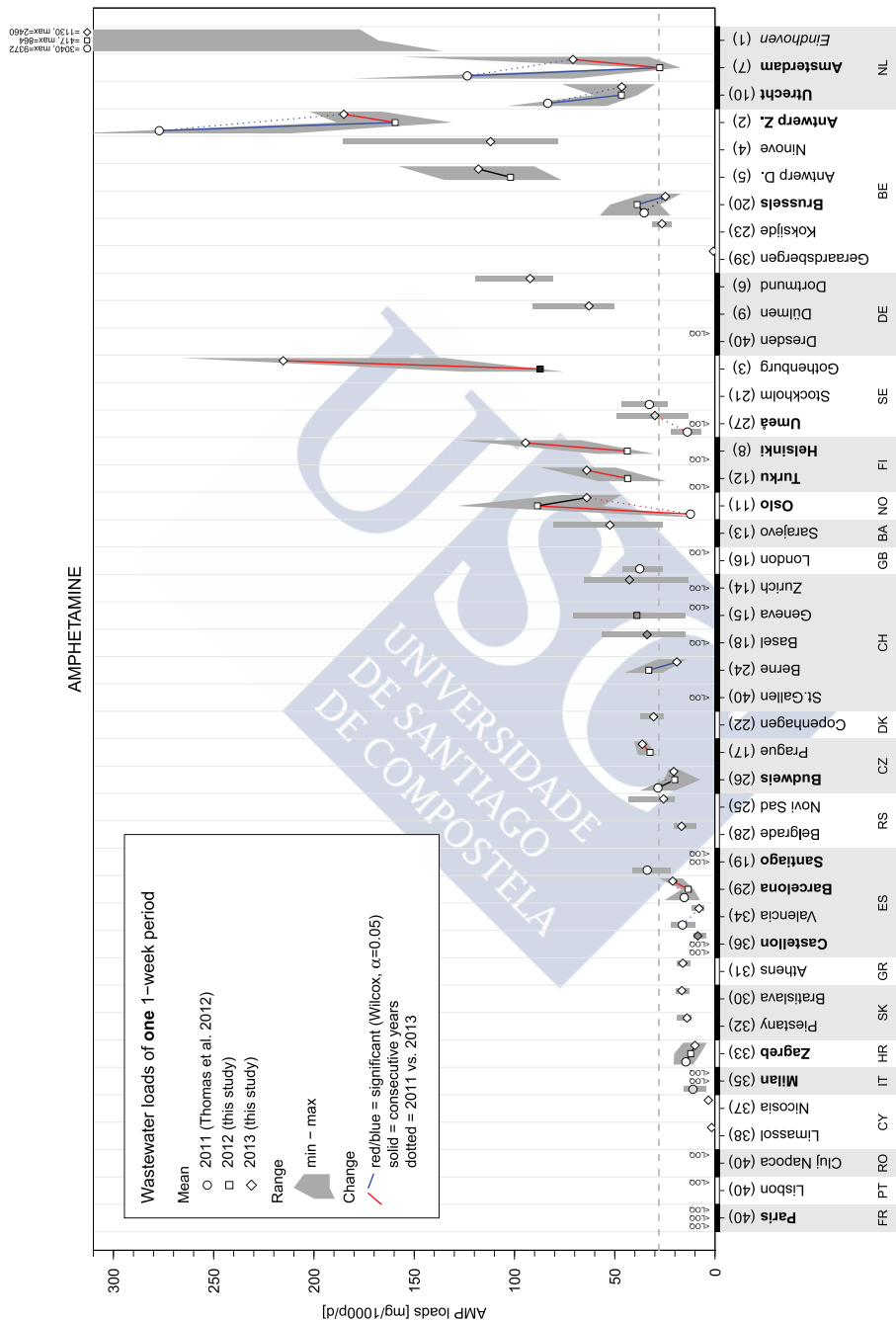


Figure 2 Population-normalized amphetamine (AMP) loads of a single 1-week period per year. See Table 1 for more information. **<LOQ**: concentrations in all daily samples were below limit of quantification (LOQ). **Grey dashed line**: 2013 overall mean of all participating cities (except Eindhoven). **Dot colour**: white: concentrations in all samples were above LOQ; grey shading: one or more concentrations were below LOQ and set to 0.5*LOQ (the darker the grey, the more concentrations were below LOQ). **Numbers in brackets**: cities' rank (average over all available years). Cities in **bold type** participated in all 3 years and were used to calculate annual overall means (see Table 2). Cities in **italic type** exhibited abnormal high values in at least 1 year (see text for more details). All P-values can be found in Supporting information, Appendix S3

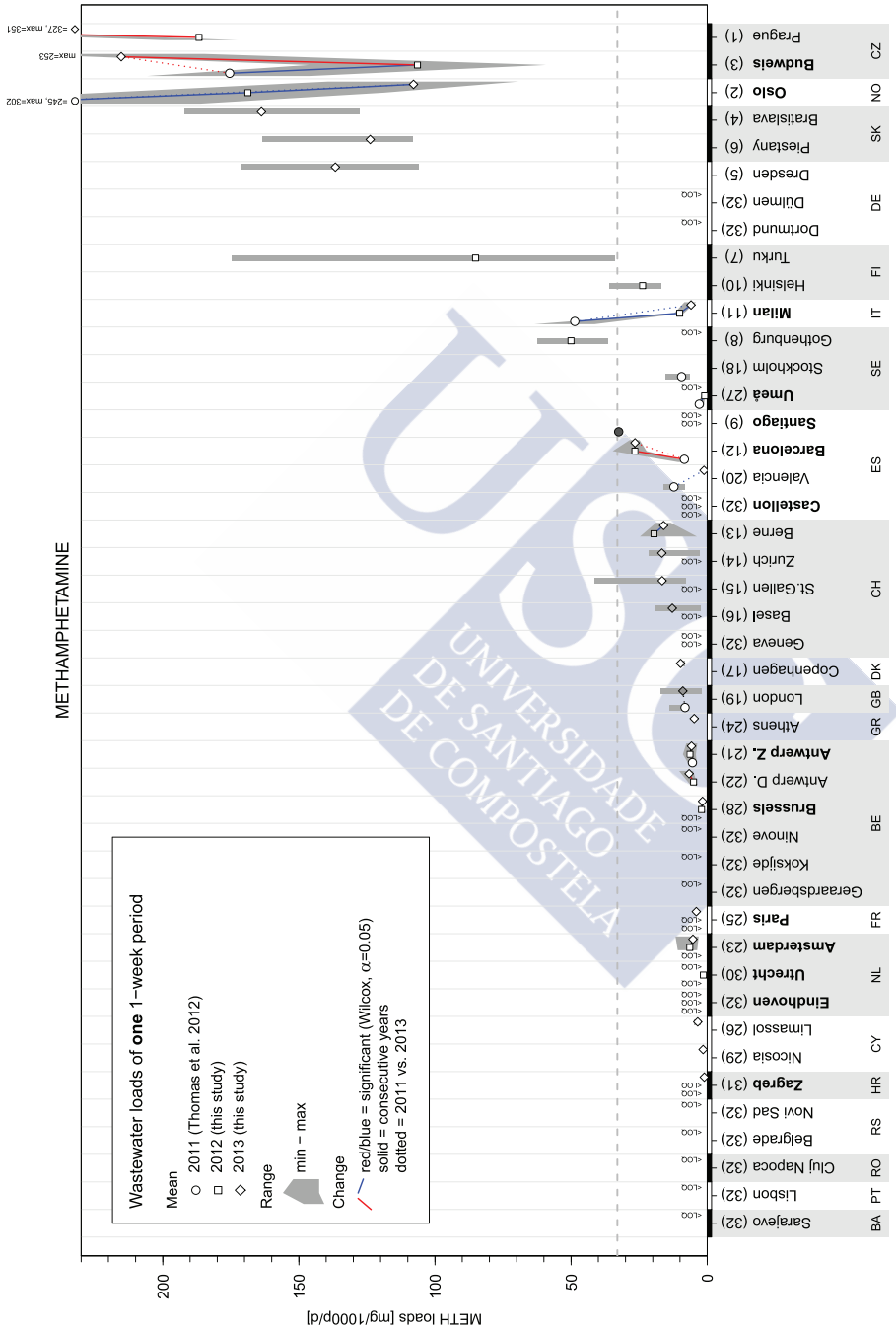


Figure 3 Population-normalized methamphetamine (METH) loads of a single 1-week period per year. See Table 1 for more information. <LOQ: concentrations in all daily samples were below limit of quantification (LOQ). **Grey dashed line:** 2013 overall mean of all participating cities. **Dot colour:** white: concentrations in all samples were above LOQ; grey shading: one or more concentrations were below LOQ and set to 0.5*LOQ (the darker the grey, the more concentrations were below LOQ). **Numbers in brackets:** cities' rank (average over all available years). Cities in **bold type** participated in all 3 years and were used to calculate annual overall means (see Table 2). All P-values can be found in Supporting information, Appendix S3

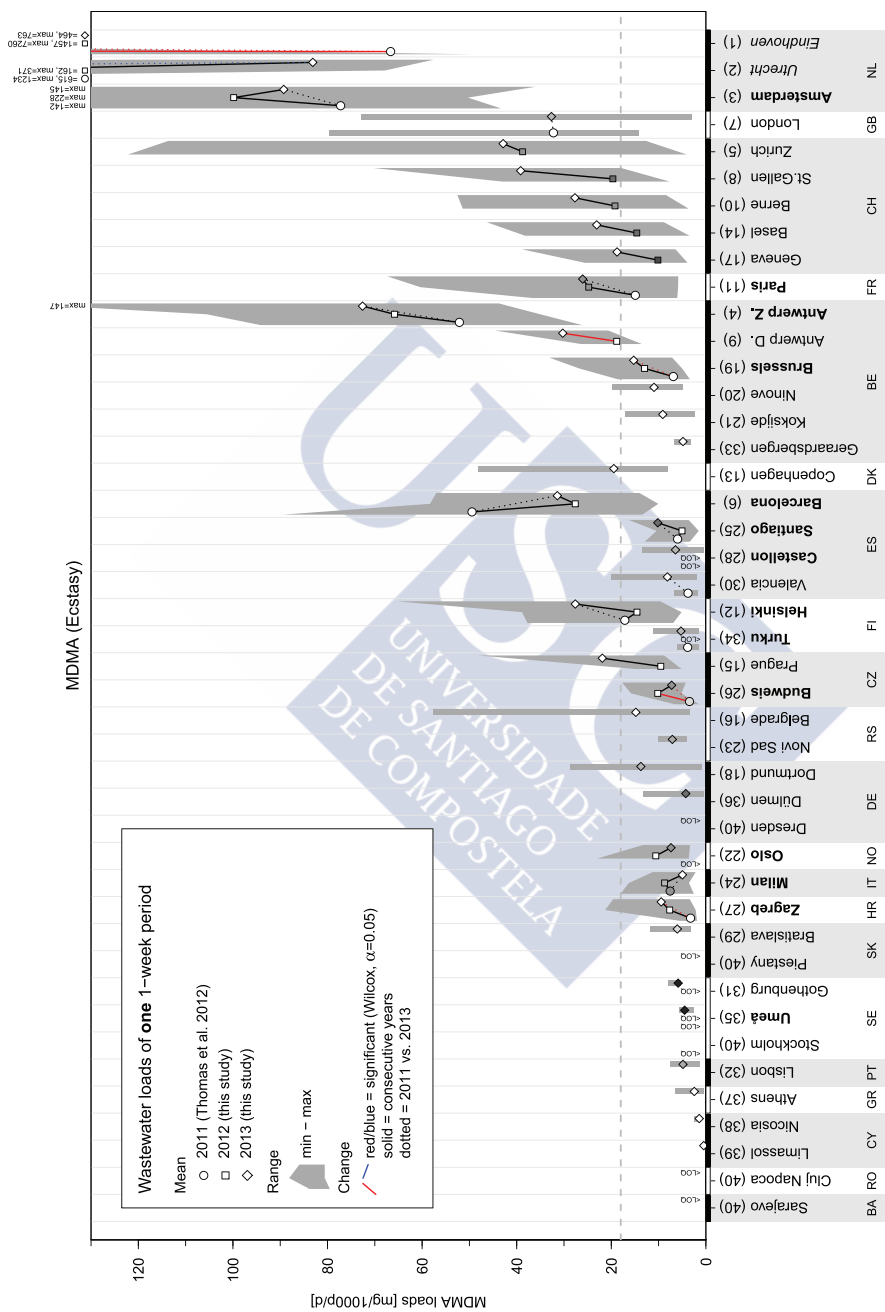


Figure 4 Population-normalized 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) loads of a single 1-week period per year. See Table 1 for more information. <LOQ: concentrations in all daily samples were below limit of quantification (LOQ). **Grey dashed line:** 2013 overall mean of all participating cities (except Utrecht and Eindhoven). **Dot colour:** white: concentrations in all samples were above LOQ; grey shading: one or more concentrations were below LOQ and set to 0.5*LOQ (the darker the grey, the more concentrations were below LOQ). **Numbers in brackets:** cities' rank (average over all available years). Cities in **bold type** participated in all 3 years and were used to calculate annual overall means (see Table 2). Cities in **italic type** exhibited abnormal high values in at least 1 year (see text for more details). All P-values can be found in Supporting information, Appendix S3

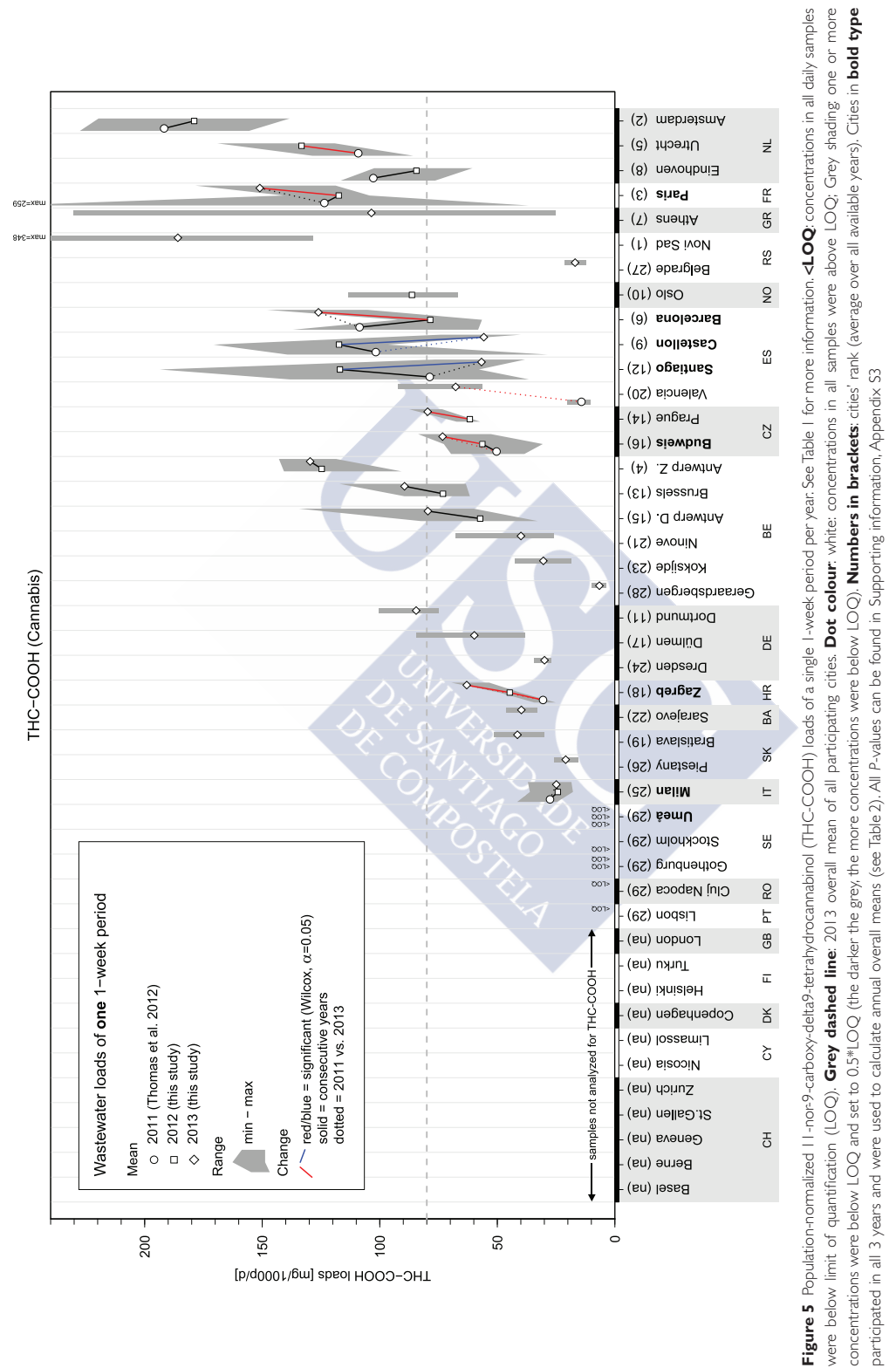


Figure 5 Population-normalized 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) loads of a single 1-week period per year. See Table 1 for more information. **<LOQ:** concentrations in all daily samples were below limit of quantification (LOQ). **Grey dashed line:** 2013 overall mean of all participating cities. **Dot colour:** white: concentrations in all samples were above LOQ; Grey shading: one or more concentrations were below LOQ and set to 0.5*LOQ (the darker the grey, the more concentrations were below LOQ). **Numbers in brackets:** cities' rank (average over all available years). Cities in **bold type** participated in all 3 years and were used to calculate annual overall means (see Table 2). All P-values can be found in Supporting information, Appendix S3

Table 2 Population-weighted overall mean loads (units = mg/1000p/d). The loads in cities with all concentration values <LOQ were set to 0. Loads range from (close to) 0 up to several 10–100 mg/1000 person/day among cities, which implies large standard deviation (SD) or 95% confidence interval (CI) for all substances' overall means. Therefore, significance of changes cannot be meaningfully assessed for overall means and is assessed at cities' individual levels only (see Figs 1–5 and Supporting information, Appendix S3)

	BE		MDMA		AMPH		METH		THC-COOH	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
2011 {14,12}	249 [8.57]	311 [14.12]	21 [7.82]	21 [13.38]	29 [8.12]	30 [13.67]	31 [7.51]	22 [13.07]	71 [4.37]	69 [7.97]
2012 {11.50}	254 [7.94]	229 [11.50]	24 [7.19]	20 [10.75]	29 [7.49]	32 [11.05]	23 [6.89]	42 [11.50]	60 [3.73]	73 [9.07]
2013 {24.74}	247 [8.77]	263 [24.74]	25 [8.02]	18 [23.99]	34 [8.32]	28 [24.20]	17 [7.71]	33 [23.68]	87 [4.53]	77 [15.98]

^aOnly cities participating in all 3 years are considered. These cities are labelled in bold type in the corresponding figures 1–5. Cities with 'explainable anomalies' for a particular substance are excluded from the calculation of overall means and labelled in italic type (even if the anomaly occurred only in 1 year). ^bAll cities participating in the corresponding year are considered except the ones that were already excluded due to 'explainable anomalies' in option a. Cities with 'explainable anomalies' for a particular substance are excluded from the calculation of overall means and labelled in italic type (even if the anomaly occurred only in 1 year). { } Total population in millions monitored (please note: not all substances were measured in all cities). [] Population in millions contributing to the corresponding overall mean. BE = benzoyllecgonine; MDMA = 3,4-methylenedioxymethamphetamine; AMPH = amphetamine; METH = methamphetamine; THC-COOH = 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

occurred. An increase in BE loads from 2012 to 2013 was observed in the Belgian and Swiss locations, while a decrease was observed in two Dutch locations (Utrecht and Amsterdam).

Besides the high variation of mean BE loads observed across Europe, this study also highlights differences among locations within countries. Results from Belgium, Czech Republic, Germany, Serbia, Slovakia, Sweden and Switzerland suggest that the consumption of COC is lower in smaller towns compared to larger cities (Table 1, Fig. 1). Qualitatively, this is in agreement with studies investigating more locations within a country [17–22], although some of these rely on grab samples or single days only. The difference between Dresden and Dortmund, two cities of similar size, is attributable to their geographic location within Germany, as discussed previously.

The population-weighted mean COC consumption, calculated from BE loads (see Calculations), for locations included in all study years is similar between years and varies from 887 mg/1000 people/day in 2013 to 912 mg/1000 people/day in 2012. With 366 million people living in the urbanized regions of the European Union and a mean purity of 39% [standard deviation (SD) = 12%] [27,28], a rough extrapolation would imply that 832 kg of street purity COC per day is consumed by the urbanized population in the European Union in 2013.

Amphetamine and methamphetamine

Because AMP is a urinary metabolite of METH and as AMP in wastewater could subsequently result from the use of METH, loads of both substances in wastewater have to be evaluated in parallel. Moreover, the use of certain prescription drugs, such as selegiline, may also result in traces of AMP and METH in wastewater following its metabolism; however, prescription rates indicate that any contribution would typically be <1% of the total AMP signal [24,29]. The most frequent amphetamine-like substance detected in the majority of the investigated locations was AMP. The highest AMP loads were found in Belgium and the Netherlands, followed by locations in northern Europe and western Germany. The locations with the highest METH loads were found in the Czech Republic, Slovakia, eastern Germany and northern Europe, while the observed METH loads in the rest of the studied locations was low to even negligible (Figs 2 and 3). The presented results suggest an apparent geographical difference in the use of the amphetamine-like stimulants. The consumption of AMP is more widespread in western Europe, while the use of METH is clearly shown in northern Europe, Slovakia and Czech Republic. The German results confirm the aforementioned trend in the

use of amphetamine-like substances. In Dülmen and Dortmund (West), relatively high AMP and negligible METH use was observed, while for Dresden (East, proximity to Czech Republic) the opposite was found.

The weighted mean of METH loads for the cities that were included in all study years declined by 45% from 2011 to 2013 (Table 2), due to some location-specific changes. For AMP, the weighted mean of the cities included in the 3 years is similar (Table 2). In contrast to BE loads, the difference in AMP and METH loads between smaller towns and bigger cities within a country is less clear.

MDMA

The highest loads of MDMA were found in western European locations, while locations in northern, eastern and southern Europe presented substantially lower MDMA loads (Fig. 4). This pattern is comparable to BE and AMP, as demonstrated by the locations within Germany, with low MDMA loads in Dresden and higher loads in Dortmund.

The weighted mean of MDMA loads for the cities included in all 3 study years was stable (Table 2). No substantial changes in per capita MDMA loads between years for the individual locations were observed, with some exceptions (Fig. 4). The mass loads of MDMA from Eindhoven in 2012 and 2013 were much higher compared to 2011, and in Utrecht significantly higher loads for MDMA were observed in 2011 compared to 2012 and 2013. An explanation for these high loads in Utrecht (2011) and Eindhoven (2012) is most probably a release of unconsumed MDMA into the sewer system that was confirmed by specific enantiomeric profiling of the wastewater [30]. These outliers were not taken into account when assessing temporal changes. MDMA loads are generally higher in larger cities compared to smaller towns, as can be seen in different locations within Belgium, Finland, Germany, Serbia and Slovakia. A notable exception is St Gallen in Switzerland, which showed MDMA loads comparable to the larger city of Zurich.

THC-COOH

The determination of THC-COOH in wastewater poses some (pre-)analytical challenges, and as a result not all laboratories could report results for this THC metabolite. Furthermore, results from the performed inter-laboratory exercises revealed that participating laboratories that reported results for THC-COOH have comparable analytical methods (Z-scores within the limits), but because of some unknown pre-analytical losses, underestimations of the absolute amounts are probably made (de Voogt *et al.*, unpublished). In the present study, however, this is not a

real issue, because the focus lies on the relative comparison of THC-COOH loads.

In contrast to the other investigated substances, no clear geographical pattern could be observed for THC-COOH loads in the different European locations (Fig. 5). The values for Amsterdam were (expectedly) the highest, as Amsterdam is known for its coffee shops and because the Netherlands produces large amounts of herbal cannabis with a relatively high content of THC [31]. Also notable are the high loads observed in the city of Novi Sad, Serbia.

The weighted mean of THC-COOH loads for cities that were included in all 3 years showed some subtle variation, pointing out a variable cannabis use (amount or potency) between 2011 and 2013 (Table 2). No clear difference in THC-COOH loads between smaller towns and larger cities could be observed from the gathered data.

DISCUSSION

Comparison of wastewater results with surveillance data

Europe has an established multi-indicator system for drug surveillance that is based on standardized demand and supply information, as well as research and intelligence sources [32]. Prevalence estimates are derived from a mixture of survey results and indirect statistical methods that try to estimate the unobserved cases from registers of observed drug users, such as treatment attendees or arrestees [33]. These methods can provide information on the main classes of users, the frequency and mode of use of a drug as well as on the purity of the substances available on the market, while WWA can provide objective and timely information on the total amount of a drug used in a specific area. These methods are highly complementary and, if used together, can substantially improve the quality of information on drug use patterns.

In terms of prevalence at the population level, the findings from WWA are broadly in agreement, with respect to relative drug use levels, with existing estimates, although they are not directly comparable. The wastewater data, however, highlight the need to consider the contribution of high and low prevalence areas in the estimates of total drug use within a population. Due to differences in demographics, the ranking of the city-based estimates reported in this study do not necessarily have to agree with national survey-based estimates. This points to the need to collect contextual information for a meaningful interpretation of wastewater data. Future monitoring campaigns should therefore (i) include more cities with different demographics within a country and (ii) evaluate monitoring design strategies to find an

optimum among feasible logistics, sufficient quality control and representativeness for an entire year [34].

The spatiotemporal data on drug use data reported are largely, but not totally, in line with what is observed from surveys and other sources. The stable levels of COC suggested by the presented wastewater data differs from other demand and supply data, which report a decline in COC use [35]. With WWA, it is currently not possible to differentiate between smaller number of people using larger amounts or vice versa, or even evaluating differences in consumption due to changes in purity. The analysis on METH and AMP accords with other data sources. The use of METH is long established in the Czech Republic, Slovakia and eastern Germany [36], and more recently supply-side data point to an increased use of METH elsewhere, especially in Scandinavian countries where it has, at times, displaced AMP. The situation appears quite dynamic and largely supply-side-driven. The wastewater data reported here accords with, and complements, the existing analysis of this situation.

For both MDMA and cannabis use, the picture is less clear. High levels of MDMA and THC-COOH might be expected in the Dutch cities sampled, but it is surprising that MDMA stands out so prominently with respect to some of the other European cities. The most recent supply-side data suggest that there is more MDMA available on the European market, and it is interesting to note that there is no evidence of this from the wastewater data reported here. The findings for THC-COOH in Amsterdam are not too surprising, as it is known for its large non-resident population using cannabis.

Uncertainty assessment

Details on estimating U_S can be found in [37,38]. Applying the same scenario as in [25]—i.e. 1% of users in the population with two relevant, substance-related toilet flushes—results in a maximum of 20% for a daily value of U_S . An objective assessment of U_C was derived from inter-laboratory tests and does not exceed 30% (de Voogt *et al.*, unpublished). Operational accuracy of flow meters (U_F) still proves to be a challenge, and in this study was assumed conservatively to be 20% [39]. Despite advances in estimating U_P [40] it remains difficult to obtain a site-specific estimate, and in our study we assume 20% (RSD) as an average [25,40]. A conservative estimate of overall uncertainty for a 7-day average based on WWA is approximately 46% (RSD) for all substances and locations (see Supporting information, Appendix S2 for more details). A sensitivity analysis reveals that reducing all four uncertainty components U_i by approximately one-quarter ($U_S \approx U_F \approx U_P \approx 15\%$, $U_C \approx 23\%$) has the same effect as trying to eliminate only one U_i (e.g. $U_C \approx 0\%$); in both cases the overall uncertainty would be around 33%.

In areas with leaky sewers the results from WWA may tend towards an underestimation of actual illicit drug loads. A certain fraction of the wastewater and illicit drugs discharged from households may not arrive at the WWTP. Information on the potential amount of exfiltration can be found in Table 1. Furthermore, in cases where population size is estimated from nutrient loads in the wastewater stream, the population could be overestimated if industrial contributions are not properly subtracted. This would lead to an underestimation of population-normalized drug loads. In contrast, WWA results may tend towards an overestimation of population-normalized drug loads if the residential population only was used for normalization, but a net increase on workdays is effective due to commuters. This and additional information is provided in Table 1 and Supporting information, Appendix S3 for further data interpretation.

CONCLUSIONS

By successfully increasing the number of participating cities to 42 in 2013 (2011: 19, 2012: 23), this is now the biggest application of WWA covering 24.74 million people. The wastewater from approximately 8 million people was analysed for BE, AMP, METH and MDMA during a 1-week period over 3 consecutive years (approximately 4 million for THC-COOH). As such, this study provides the most actual evidence for the quantification of spatial differences and temporal changes in the consumption of illicit drugs across European regions. Relatively stable loads for all investigated substances were observed, except for METH (apparent decline in 2012). In general, spatial differences were in agreement with surveillance data, where available. Wastewater analysis provides the possibility to collect, and report, measurements more quickly and regularly than is the current norm for national surveys. Wastewater analysis provides a unique opportunity to obtain near-real-time data on illicit drug use and for future comparison with other surveillance data, or particularly where such data are missing. Therefore, it should be considered for implementation on an annual or even more frequent basis. Systematically gathering information on catchment characteristics (sewer system and population) seems as indispensable as inter-laboratory tests for a meaningful comparison of wastewater data, which requires concerted efforts of numerous partners and disciplines.

Acknowledgements

Financial support This study was supported by the following countries: Belgium: FWO Flanders and University of Antwerp; Croatia: Croatian Ministry of Science, Education and Sports (Project no. 098-982934-2712); Czech

Republic: CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024 and GAJU 087/2013/Z; Finland: Maa-ja vesiteknikaan tuki ry, the Finnish Graduate School for Environmental Science and Technology; Italy: Dipartimento Politiche Antidroga (Presidenza del Consiglio dei Ministri) (Project Aqua Drugs); Norway: Research Council of Norway (185523/V50); Spain: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project CTQ2010-18927, SCARCE Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065, EMERFOR CGL2011-29703-C02-02, CTQ2012-36189), CSIC-JAE, Generalitat Valenciana (ISIC/2012/016 and PROMETEO/2009/054); UK: the University of Huddersfield; The European Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA); European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration (grant agreement no. 317205, ITN SEWPROF). **Sampling support and provision of catchment information** Belgium: Jean-François Mougel, Alain Vandelanoot; Bosnia and Herzegovina: Simone Milanolo; Croatia: Marin Ganjto; Czech Republic: Jiri Stara, Karel Vondra; Denmark: Benedek G. Plósz, Pedram Ramin; Finland: Nina Leino, Kari Murttonen, Jenny-Maria Brozinski; France: Anne-Claire Gaudicheau, Bruno Marion, Roland Nedelec; Germany: Martin Freund, Torsten Frehmann, Astrid Linnenlücke, Norbert Lucke; the Netherlands: Alex Veltman, Peter Theijssen, Peter van Dijk, Stefan Wijers, Mark Stevens, Ferry de Wilde; Norway: Pia Ryrfors and colleagues; Portugal: Eugénia Cardoso, José Martins; Serbia: Srdjan Kovacevic, Anđelka Petković, Maja Sremacki; Slovakia: Igor Bodík; Spain: Aquagest, Julio Vasco, Pere Aguilo, Begoña Martínez, Carlos Ferrer, Isabel Tormos, Vicente Cabrera, David Castell, Enrique Albors, Gloria Fayos, M^a José Tarrega, Carmen Ferrer; Switzerland: Christian Abegglen, Hanspeter Bauer, Heinz Frömel, Andreas Schiller, Axel Wahl; UK: Leon Barron and Kelly Munro. **Analytical support** Belgium: Juliet Kinyua; Croatia: Ivona Krizman; Cyprus: Evroula Hapeshi; France: Sara Karolak; Greece: Viola Borova and Nikiforos Alygizakis; Italy: Andrea Borsotti and Nikolaos Rousis; Norway: Jose Antonio Baz Lomba and Yeonsuk Ryu; Sweden: Jerker Fick and Richard Lindberg; UK: David Baker.

Declaration of interests

None.

References

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Assessing Illicit Drugs in Sewage—Potential and Limitations of A New Monitoring Approach. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2008.
- Griffiths P, Mounteney J. Drug trend monitoring. In: Miller P. G., Strang J., Miller P. M., editors. *Addiction Research Methods*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010, pp. 337–54.
- Zuccato E., Chiabrando C., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ Health Perspect* 2008; **116**: 1027–32.
- van Nuijs A. L. N., Castiglioni S., Tarcomnicu I., Postigo C., de Alda M. L., Neels H. *et al.* Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: a critical review. *Sci Total Environ* 2011; **409**: 3564–77.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). The challenge of new psychoactive substances. UNODC, Vienna, 2013.
- Karolak S., Nefau T., Bailly E., Solgadi A., Levi Y. Estimation of illicit consumption by wastewater analysis in Paris area. *Forensic Sci Int* 2010; **200**: 153–60.
- Metcalfe C., Tindale K., Li H., Rodayan A., Yargeau V. Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. *Environ Pollut* 2010; **158**: 3179–85.
- Terzic S., Senta I., Ahel M. Illicit drugs in wastewater of the city of Zagreb (Croatia)—estimation of drug abuse in a transition country. *Environ Pollut* 2010; **158**: 2686–93.
- Irvine R. J., Kostakis C., Felgate P. D., Jaehne E. J., Chen C., White J. M. Population drug use in Australia: a sewage analysis. *Forensic Sci Int* 2011; **210**: 69–73.
- Reid M. J., Langford K. H., Morland J., Thomas K. V. Quantitative assessment of time dependent drug-use trends by the analysis of drugs and related metabolites in raw sewage. *Drug Alcohol Depend* 2011; **119**: 179–86.
- van Nuijs A. L. N., Mougel J.-F., Tarcomnicu I., Bervoets L., Blust R., Jorens P. G. *et al.* Sewage epidemiology—a real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environ Int* 2011; **37**: 612–21.
- Bijlsma L., Emke E., Hernandez F., de Voogt P. Investigation of drugs of abuse and relevant metabolites in Dutch sewage water by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Chemosphere* 2012; **89**: 1399–406.
- Harman C., Reid M., Thomas K. V. *In situ* calibration of a passive sampling device for selected illicit drugs and their metabolites in wastewater, and subsequent year-long assessment of community drug usage. *Environ Sci Technol* 2011; **45**: 5676–82.
- Lai F. Y., Bruno R., Hall W., Gartner C., Ort C., Kirkbride P. *et al.* Profiles of illicit drug use during annual key holiday and control periods in Australia: wastewater analysis in an urban, a semi-rural and a vacation area. *Addiction* 2013; **108**: 556–65.
- Zuccato E., Castiglioni S., Tettamanti M., Olandese R., Bagnati R., Melis M. *et al.* Changes in illicit drug consumption patterns in 2009 detected by wastewater analysis. *Drug Alcohol Depend* 2011; **118**: 464–9.
- Chen C., Kostakis C., Harpas P., Felgate P. D., Irvine R. J., White J. M. Marked decline in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) based on wastewater analysis. *J Stud Alcohol Drugs* 2011; **72**: 737–40.
- Huerta-Fontela M., Galceran M. T., Martin-Alonso J., Ventura F. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Sci Total Environ* 2008; **397**: 31–40.
- van Nuijs A. L. N., Pecceu B., Theunis L., Dubois N., Charlier C., Jorens P. G. *et al.* Can cocaine use be evaluated through analysis of wastewater? A nation-wide approach conducted in Belgium. *Addiction* 2009; **104**: 734–41.

19. Kankaanpää A., Ariniemi K., Heinonen M., Kuoppasalmi K., Gunnar T. Use of illicit stimulant drugs in Finland: a wastewater study in ten major cities. *Sci Total Environ*; in press; 2014; doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.095
20. Vuori E., Happonen M., Gergov M., Nenonen T., Järvinen A., Ketola R. A. *et al.* Wastewater analysis reveals regional variability in exposure to abused drugs and opioids in Finland. *Sci Total Environ*; in press; 2014; doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.010
21. Östman M., Fick J., Näsström E., Lindberg R. H. A snapshot of illicit drug use in Sweden acquired through sewage water analysis. *Sci Total Environ* 2014; **472**: 862–71.
22. Nefau T., Karolak S., Castillo L., Boireau V., Levi Y. Presence of illicit drugs and metabolites in influents and effluents of 25 sewage water treatment plants and map of drug consumption in France. *Sci Total Environ* 2013; **461–462**: 712–22.
23. Banta-Green C. J., Field J. A., Chiaia A. C., Sudakin D. L., Power L., deMontigny L. The spatial epidemiology of cocaine, methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) use: a demonstration using a population measure of community drug load derived from municipal sewage. *Addiction* 2009; **104**: 1874–80.
24. Thomas K. V., Bijlsma L., Castiglioni S., Covaci A., Emke E., Grabic R. *et al.* Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Sci Total Environ* 2012; **432**: 432–9.
25. Castiglioni S., Bijlsma L., Covaci A., Emke E., Hernandez F., Reid M. *et al.* Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers. *Environ Sci Technol* 2013; **47**: 1452–60.
26. Lai F. Y., Ort C., Gartner C., Carter S., Prichard J., Kirkbride P. *et al.* Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Res* 2011; **45**: 4437–48.
27. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Urbanization Prospects: The 2011 Revision, CD-ROM edition. 2012. New York, NY.
28. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Purity of cocaine products at retail level, 2011. Available at: <http://www.emcdda.europa.eu/stats13#display:/stats13/ppptab7a> (accessed 12 December 2013).
29. Baker D. R., Barron L., Kasprzyk-Hordern B. Illicit and pharmaceutical drug consumption estimated via wastewater analysis. Part A: chemical analysis and drug use estimates. *Sci Total Environ*; in press; 2014; doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.107
30. Emke E., Evans S., Kasprzyk-Hordern B., de Voigt P. Enantiomer profiling of high loads of amphetamine and MDMA in communal sewage: a Dutch perspective. *Sci Total Environ*; in press; 2014; doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.043
31. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *EU Drug Market Reports—A Strategic Analysis*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2013.
32. Griffiths P., Mounteney J., Lopez D., Zobel F., Götz W. Addiction research centres and the nurturing of creativity. Monitoring the European drug situation: the ongoing challenge for the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *Addiction* 2012; **107**: 254–8.
33. Frischer M., Hickman M., Kraus L., Mariani F., Wiessing L. A comparison of different methods for estimating the prevalence of problematic drug misuse in Great Britain. *Addiction* 2001; **96**: 1465–76.
34. Ort C., Eppler J. M., Scheidegger A., Rieckermann J., Kinzig M., Sörgel F. Challenges of surveying wastewater drug loads of small populations and generalizable aspects on optimizing monitoring design. *Addiction* 2014; **109**: 472–81.
35. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *European Drug Report 2013: Trends and Developments*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2013.
36. Pietsch J., Paulick T., Schulz K., Flössel U., Engel A., Schmitter S. *et al.* Escalation of methamphetamine-related crime and fatalities in the Dresden region, Germany, between 2005 and 2011. *Forensic Sci Int* 2013; **233**: 51–4.
37. Ort C., Lawrence M. G., Reungoat J., Mueller J. F. Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies. *Environ Sci Technol* 2010; **44**: 6289–96.
38. Ort C., Lawrence M. G., Rieckermann J., Joss A. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol* 2010; **44**: 6024–35.
39. Thomann M. Quality evaluation methods for wastewater treatment plant data. *Water Sci Technol* 2008; **57**: 1601–9.
40. O'Brien J. W., Thai P. K., Eaglesham G., Ort C., Scheidegger A., Carter S. *et al.* A model to estimate the population contributing to the wastewater using samples collected on census day. *Environ Sci Technol* 2014; **48**: 517–25.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Appendix S1 Questionnaire 2012 and 2013.

Appendix S2 Uncertainty estimation.

Appendix S3 Answers from questionnaire, all analytical data 2012 and 2013, means and *P*-values for changes of one week to another for all substances and locations (different spread sheets in separate Excel file).

Appendix S4 Weekly variation of drug loads 2012 (separate pdf file).



A continuación se recogen otros artículos a modo de anexo en los que se ha participado durante la etapa de formación, si bien no forman parte del trabajo que constituye esta Tesis:

- T. Rodríguez-Álvarez, I. Racamonde, I. González-Mariño, A. Borsotti, R. Rodil, I. Rodríguez, E. Zuccato, J. B. Quintana, S. Castiglioni, Alcohol and cocaine co-consumption in two European cities assessed by wastewater analysis, enviado a Sci. Total Environ. (2015).
- E. Villaverde-de-Sáa, M. Fernández, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Racamonde, R. Cela, Solid-phase extraction of perfluoroalkylated compounds from sea water, aceptado en J. Sep. Sci (2015). doi: 10.002/jssc.201401453
- A. M. Carro, S. Fernández, I. Racamonde, D. García-Rodríguez, P. González, R.A. Lorenzo, Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization-large volume injection-gas chromatography-tandem mass spectrometry for multiclass pesticides in water, J. Chromatogr. A 1253 (2012) 134-143.
- E. Villaverde-de-Sáa, I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, C. Cela, Ion-pair sorptive extraction of perfluorinated compounds from water with low-cost polymeric materials: Polyethersulfone vs polydimethylsiloxane, Anal. Chim. Acta 740 (2012) 50-57.
- R.A. Lorenzo, S. Pais, I. Racamonde, D. García-Rodríguez, A. M. Carro, Pesticides in seaweed: optimization of pressurized liquid extraction and in-cell clean-up and analysis by liquid chromatography-mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 173-181.
- P. González, I. Racamonde, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, Combined solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry used for determination of chloropropanols in water, J. Sep. Sci. 34 (2011) 2697-2704.
- I. Racamonde, P. González, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, Determination of chloropropanols in foods by one-step extraction and derivatization using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6878-6883.



The following typographic errors were detected during the proofreading of this PhD dissertation:

- In the publication III.1 *“Determination of Δ 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography–mass spectrometry”* (page 190) the m/z of the IS (THCCOOH-d₃) in fig.4 should be “374.26”.

-In the publication III.3 *“Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography–tandem mass spectrometry”* (page 207) here is a mistake with R1 and R3 substituents in NDIA and MPHEN. For NDIA, R1 should be “Cl” and R3 should read “H”. For MPHEN, R1 should be “OCH₃”.

-In the publication III.4 *“Application of polypropylene tubes as single-use and low cost sorptive extraction materials for the determination of benzodiazepines and zolpidem in water samples”* (page 233) the “MRM transition quantifier” for AHALP in table 1 should be “325.3 (88)→216 (36.5)”